

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**VALIDACIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN MOLECULAR 3M™ PARA  
*LISTERIA SP* Y *SALMONELLA SP* EN MUESTRAS ALIMENTICIAS Y  
AMBIENTALES DE LA EMPRESA PARADISE INGREDIENTS**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como  
requisito parcial para optar al título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología.**

Ingrid Méndez Quesada

Cartago, Noviembre, 2019

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**VALIDACIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN MOLECULAR 3M™ PARA  
*LISTERIA SP* Y *SALMONELLA SP* EN MUESTRAS ALIMENTICIAS Y  
AMBIENTALES DE LA EMPRESA PARADISE INGREDIENTS**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como  
requisito parcial para optar al título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología.**

Ingrid Méndez Quesada

Cartago, Noviembre, 2019

## Resumen

La seguridad alimentaria garantiza que los alimentos no causen daños al consumidor. Los microorganismos como *Salmonella* y *Listeria* pueden causar enfermedades, es importante que las industrias alimentarias tengan planes de monitoreo que aseguren la limpieza de estas superficies y la seguridad alimentaria de sus productos. El Sistema de Detección Molecular (MDS) 3M™ amplifica rápidamente las secuencias únicas de ácido nucleico de ADN con alta especificidad y sensibilidad. Es muy importante validar el método en el tipo de alimento que desea usar. También es necesario establecer las condiciones del método que se aplicará y verificar el cumplimiento de los requisitos. El método 3M™ MDS se comparó con el método tradicional de análisis en dos tipos de muestras: puré de banano congelado tomado en tres tiempos de producción diferentes y tres puntos diferentes de superficie. Ambos fueron analizados en formas contaminadas y no contaminadas para cada tipo de microorganismo. Las muestras contaminadas artificialmente para *Listeria sp* se detectaron en ambos métodos. Para las superficies se detectó *Salmonella sp* en las muestras contaminadas en ambos métodos, para el puré de banano congelado con 3M™MDS no se detectaron las muestras contaminadas, todos los resultados fueron negativos. Se puede concluir que 3M™ MDS es una herramienta válida para la detección de *Listeria sp* en puré de banano congelado y superficies. En *Salmonella sp* 3M™MDS es una herramienta válida para la detección en superficies pero en el puré de banano congelado no se ha validado en las condiciones en que se realizó este estudio.

**Palabras clave:** *Inocuidad, Salmonella sp, Listeria sp, validación, MDS de 3M™, método tradicional*

## Abstract

Food safety is the guarantee that food will not cause harm to the consumer. Since microorganisms like *Listeria* and *Salmonella* can cause serious illness in humans, it is important for food industries to have monitoring plans to ensure the proper cleanliness of their surfaces as well as the microbiological safety of their products. The 3M™ Molecular Detection System (MDS) rapidly amplifies the unique DNA sequences in the microorganisms with high specificity and sensitivity. It is of great importance to validate this method for the specific type of food product or surface for which it is intended to be used for monitoring. It is also necessary to verify that the conditions of the method will be as required and that every other additional requirement for its usage will be complied. The 3M™ MDS method was compared with the traditional method of analysis in two types of samples: frozen banana puree taken at three different production times and three different spots of a surface. Both were analyzed in contaminated and uncontaminated forms for each type of microorganism. *Listeria* was detected in all the contaminated samples by both methods. *Salmonella* was detected by both methods in all the contaminated surfaces, while in the contaminated samples of banana puree, 3M™ MDS failed to detect it. It can be concluded that 3M™ MDS is a valid tool for the detection of *Listeria* in both frozen banana puree and the sampled surface as well as for the detection of *Salmonella* in such surface, while it is not a valid tool for the detection of *Salmonella* in frozen banana puree, under the conditions in which this study was conducted.

**Keywords:** Food Safety, *Salmonella sp*, *Listeria sp*, validation, 3M™ MDS, traditional method

## Acreditación

**Validación del sistema de Detección Molecular 3M™ para *Listeria sp* y *Salmonella sp* en muestras alimenticias y ambientales de la empresa paradise ingredients**

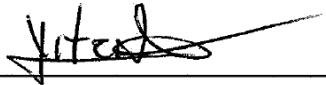
**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología.**

### Miembros del Tribunal



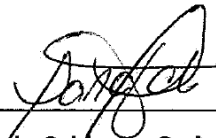
---

**MSc. Olga Rivas Solano  
Profesor Asesor-ITCR**



---

**Lcda. Nitzi Alvarado López  
Asesor- Empresa**



---

**MSc. Carla Calderón Ortiz  
Lector-Empresa**

## Dedicatoria

### **DEDICATORIA**

A mis padres y hermanos por su  
apoyo durante mis estudios  
Ingrid Méndez Quesada

## Agradecimientos

Agradezco a mis tutores y a los profesores que me acompañaron y apoyaron durante la realización de este proyecto.

A Luis Diego Quesada representante de 3M por su apoyo con el equipo MDS y por los consejos brindados, a Maybell Navarro asesora comercial de Ingeniería Verde por brindarme información solicitada.

Agradezco a mis compañeros en Laboratorio central de Paradise Insgredients y a los inspectores por brindarme su ayuda.

Agradezco a mi familia que me han acompañado y apoyado siempre para la realización de todos mis proyectos.

## Índice General

<b>INDICE GENERAL</b>	<b>Pág.</b>
RESUMEN.....	i
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE GENERAL.....	vi
INDICE DE CUADROS.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE ANEXOS.....	vii
INTRODUCCION.....	6
REVISION DE LITERATURA.....	8
OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECIFICOS.....	20
MATERIALES Y METODOS.....	21
RESULTADOS.....	27
DISCUSION.....	35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	40
Conclusiones.....	40
Recomendaciones.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	41
ANEXOS.....	46

## Índice de Cuadros

### INDICE DE CUADROS

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Concentración del inóculo	27
2	Resultados obtenidos para <i>Listeria sp</i>	28
3	Resultados estadísticos para <i>Listeria sp</i>	28
4	Resultados obtenidos para <i>Salmonella sp</i>	31
5	Resultados estadísticos para <i>Salmonella sp</i>	32

## Índice de Figuras

### INDICE DE FIGURAS

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Diagrama del proceso de producción de puré de banano congelado (de pelado hasta despacho)	9
2	Amplificación Isotérmica de ADN (LAMP)	16
3	Proceso enzimático de Detección Molecular 3M™	17
4	Puntos de línea congelado para validación	21
5	Absorbancia de muestras a 625 nm	22
6	Puntos de muestreo para <i>Listeria monocytogenes</i>	24



7	Puntos de muestreo para <i>Salmonella sp</i>	25
8	Expresión de cálculos para parámetros de validación	26
9	Cultivo por vertido en placa de dilución 10 <sup>1</sup>	27
10	Resultados prueba exacta de Fisher y análisis Kappa de Fleiss para <i>Listeria monocytogenes</i>	29
11	Resultados obtenidos para puré de banano <i>Listeria monocytogenes</i>	29
12	Resultados obtenidos para puré de banano <i>Listeria monocytogenes</i> con tres semanas de congelación	30
13	Resultados obtenidos para superficies <i>Listeria monocytogenes</i>	31
14	Resultados prueba exacta de Fisher para <i>S. enterica sv Typhimurium</i>	32
15	Resultados obtenidos para puré de banano <i>S. enterica sv Typhimurium</i>	33
16	Resultados obtenidos para puré de banano <i>S. enterica sv Typhimurium</i> con 1ml de inóculo 10 <sup>1</sup> en 25g de muestra	33
17	Resultados obtenidos para superficies <i>S. enterica sv Typhimurium</i>	34

## Índice de Anexos

### INDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Resultados analisis externos puré de banano <i>Listeria sp</i>	46
2	Resultados analisis externos puré de banano <i>Salmonella sp</i>	47
3	Resultados analisis externos superficies <i>Listeria sp</i>	48
4	Resultados analisis externos superficies <i>Salmonella sp</i>	49
5	Resultados analisis monitoreo de superficies	50
6	Resultados pruebas de interferencia de matrices	52

## Introducción

La alimentación es un elemento básico para la vida y el desarrollo humano, por lo tanto mantener la seguridad alimentaria y nutricional es un tema prioritario tanto a nivel nacional como internacional. Esto incluye que las personas puedan acceder y gozar de alimentos de calidad para su adecuado consumo y utilización biológica, además, que les garantice bienestar general (Ministerio de salud, 2011).

La inocuidad de los alimentos se define como, la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso a que se destinan. Para ello se utilizan criterios microbiológicos de inocuidad que indican la aceptabilidad de un producto o un lote de un alimento basado en la ausencia, presencia o cantidad de microorganismos (Decreto 41.420-COMEX-S-MAG-MEIC, 2018). La inocuidad es la ausencia de contaminantes, adulterantes, toxinas y otras sustancias que puedan hacer nocivo el alimento para la salud y abarca acciones que puedan garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos desde la producción hasta el consumo (Ministerio de salud, 2011).

Cuando un alimento no es inocuo podrían presentarse enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), estas enfermedades son causadas por la ingesta de alimentos o agua contaminada con microorganismos o parásitos. Estos microorganismos patógenos se pueden adaptar a ciertas condiciones por ejemplo: un cambio en la línea productiva, cambios en los procesos, el comercio internacional, grupos de poblaciones expuestas a riesgos o cambios en el estilo de vida ( Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS Sobre las Normas Alimentarias, 2007).

Entre estos microorganismos podemos encontrar a *Listeria monocytogenes* que es una bacteria oportunista (afecta principalmente a personas susceptibles), grampositiva y anaerobia facultativa, puede causar meningitis, encefalitis, septicemia, gastroenteritis, mastitis y abortos tardíos (Fortes; David; Koeritzer; Wiedmann, 2013).

Otro microorganismo patógeno es *Salmonella sp*, una bacteria gramnegativa que no forma esporas y pueden ser móviles, hay más de 2500 serotipos identificados. Causa diarrea, fiebre y calambres abdominales, en ancianos y bebés, pueden propagarse e incluso causar la muerte si no se trata (Fortes; David; Koeritzer; Wiedmann, 2013).

Para evitar que los alimentos producidos lleguen a no ser inocuos se deben de tener ciertas medidas a largo de la cadena productiva, además, realizar análisis que permitan su pronta identificación como, además, disminuir la mortalidad y los gastos económicos en caso de una contaminación por ejemplo los métodos de detección rápida de patógenos (Hernández-Porras, y otros, 2017).

Estos métodos, son todos aquellos que brindan resultados más rápido que los convencionales, generalmente se agrupan en tres categorías: inmunológicos, biosensores y basados en ácidos

nucleicos, como el Sistema de detección Molecular (MDS) 3M™ (Fortes; David; Koeritzer; Wiedmann, 2013).

Sin embargo, a pesar de la efectividad de los métodos es necesario realizar una validación de estos, para asegurar que la herramienta satisface su uso previsto. Al realizar una validación se obtiene como resultado una declaración sobre el cumplimiento, o incumplimiento de los requisitos para el uso o aplicación dada, sustentada en evidencias objetivas ( Lazos Martínez & Hernández Gutiérrez, 2004).

La empresa Paradise Ingredients, anteriormente conocida como Gerber Ingredients, es una empresa ubicada al oeste de la provincia de Cartago. Entre sus actividades está la producción de puré de banano congelado, puré de banano aséptico y a la producción de esencia de banano; estos productos son exportados a mercados de Norteamérica, Suramérica y Europa ( Paradise Ingredients, 2019).

Como parte de la política de la empresa está el mantener la inocuidad de los productos, incluido el puré de banano congelado. Por esta razón surge la necesidad de tener un método de detección, en el laboratorio interno, que sea efectivo y esté validado; para garantizar que los productos no causarán daño al consumidor.

Por esta razón se plantea validar el Sistema de Detección Molecular 3M™ para la Detección de *Listeria sp* y *Salmonella sp* en Puré de Banano Congelado y muestras ambientales en la empresa Paradise Ingredients.

## Revisión de literatura

### Inocuidad en Industrias de alimentos

El significado de inocuidad es proveer alimentos que no afecten la salud de los consumidores, es garantizar que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen o consuman de acuerdo al uso previsto (FAO). Mantener la inocuidad es fundamental para mantener la vida y la buena salud de los consumidores, esto es importante debido a que se estima que cada año enferman por alimentos contaminados unos 600 millones de personas y 420 000 mueren (OMS, 2017).

Otra de las razones de mantener la inocuidad es que se fortalece la economía nacional, la industrialización y producción. Además, la calidad e inocuidad que brinda una empresa abre más mercados y credibilidad a la marca vendida. Un problema con inocuidad significa pérdida de dinero, clientes e inversión. Para mantener inocuidad se plantean diferentes procedimientos que disminuyan el riesgo de contaminación, ya que, puede suceder en cualquier etapa del proceso de fabricación y distribución (OMS, 2017). Programas como buenas prácticas de manufactura, HACCP, manipulación correcta de alimentos hasta las certificaciones internacionales buscan disminuir estos riesgos.

En Paradise Ingredients la calidad e inocuidad son parte de su política integrada. Mediante un plan de monitoreo ambiental, medidas específicas para cada tipo de producto terminado y un método de detección oportuno, se busca disminuir el riesgo de contaminación por patógenos.

La empresa inició en el año 1968 en Costa Rica; como Productos Gerber de Centroamérica S.A; a partir de 1977 incursionó en el procesamiento de pulpa de banano. Para el año 2000 Gerber Ingredients S.A se trasladó a la zona industrial de Cartago. Posteriormente en el 2016 el fondo privado de capital, Caseif III LP, adquiere la fábrica Gerber Ingredients, con el fin de potenciar sus operaciones. Por lo que la fábrica cambia su nombre a Paradise Ingredients localizada detrás del Parque Industrial Z de Cartago.

Entre sus productos se encuentran esencia de banano, puré de banano aséptico y concentrado congelado, que son exportados a Estados Unidos, Europa, Asia y Latinoamérica (Fallas, 2016).

En la línea de banano congelado se obtiene como uno de sus productos finales un puré de banano congelado concentrado con 40.5 brix. Este producto es de un color crema natural y sabor a natural no tiene ningún aditivo y no contienen organismos genéticamente modificados. Tiene un pH de 4.7 a 5.2 y una acidez de 0.40 a 0.60 (Paradise Ingredients, 2019).

Es un producto intermedio a granel que se utiliza como materia prima para otros procesos, se comercializa en tambores cilíndricos de 230kg (Paradise Ingredients, 2019).

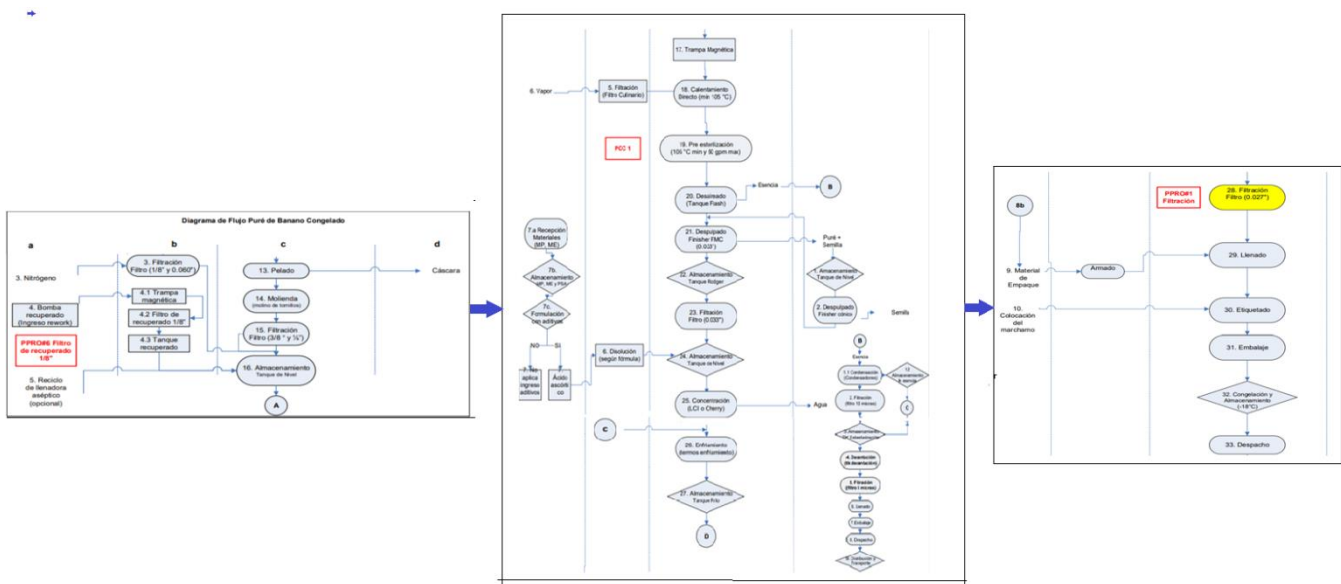
Un alimento congelado se almacena constantemente a 0°F (-17.8 °C), a esta temperatura se disminuye el movimiento de las moléculas causando que los microorganismos entren en una fase dormiente (Food Safety and Inspection Service, 2015).

La velocidad de congelación afecta la calidad de los alimentos, al estar en congelación por períodos extensos se inactivan muchos de los microorganismos como bacterias, levaduras y hongos. Sin embargo, cuando se descongela un producto los microorganismos pueden activarse nuevamente, multiplicándose en las condiciones apropiadas a niveles que pueden ocasionar enfermedades (Food Safety and Inspection Service, 2015).

En la empresa Paradise Ingredients para producción de puré de banano congelado concentrado natural se realizan diferentes etapas. En las primeras etapas está la recepción, transporte y selección de banano verde. Posteriormente se realiza una maduración del banano por medio de gaseado con etileno, este banano se transporta a planta donde se verifica que cumpla con las condiciones de maduración que sean requeridas.

El banano maduro pasa a una pila y luego a una banda donde será pelado. En las etapas posteriores están la molienda, filtración calentamiento, pre-esterilización, almacenamiento en tanque frío, concentración, enfriamiento, llenado, almacenamiento y distribución del puré de banano congelado concentrado natural (figura 1).

**Figura 1. Diagrama del proceso de producción de puré de banano congelado desde el pelado hasta el despacho.**



**Fuente:** HACCP Línea de puré de banano congelado, 2019.

Para mantener la inocuidad de el puré de banano congelado, en la empresa Paradise Ingredients se mantienen monitoreos microbiológicos al producto final, en este caso para el pure de banano congelado concentrado natural, además, de los análisis de indicadores de calidad, se realizan análisis de patógenos, por lo tanto es de gran interés para la empresa utilizar un método rápido y confiable.

### **Importancia de muestreos ambientales en la industria alimentaria**

Un programa de monitoreo ambiental de patógenos, es una medida para verificar la eficacia de los programas para el control en la planta, se incluyen áreas de más riesgo y áreas lejanas a esta. El solo realizar pruebas a producto terminado es una estrategia pobre ante la ausencia de un programa monitoreo (Almond Board of California, 2010).

Los monitoreos ambientales y de superficies van a permitir verificar las condiciones de limpieza de equipos e instalaciones, ya que, se debe de evitar la formación de biopelículas en los equipos, pisos, paredes, drenajes y tuberías (Hernández-Porras, y otros, 2017).

Se deben identificar las áreas potenciales de riesgo y el flujo del proceso, además, hacer énfasis en los posibles puntos potenciales de recontaminación del producto (Almond Board of California, 2010). Por ejemplo las personas encargadas de limpiar desagüaderos no deberían entrar en contacto ni limpiar las superficies que entran en contacto con los alimentos sin antes cambiarse de ropa, lavar y desinfectar las manos e instrumentos. Mediante estudios a largo plazo se puede mantener una vigilancia y mejora de los programas de limpieza (Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS Sobre las Normas Alimentarias, 2007).

Para un programa de monitoreo se debe de tener en cuenta lugares con grietas, hendiduras, soldaduras ásperas, tubos y soportes huecos, montajes próximos de superficies de metal a metal o de metal a plástico, cierres y juntas estropeados u otras zonas que no pueden alcanzarse durante la labor normal de limpieza y desinfección de las superficies y zonas adyacentes que entran en contacto con los alimentos. Para monitoreo de patógenos como *L. monocytogenes* se debe de mostrar lugares fríos y que alberguen condensación como por ejemplo refrigeradores ( Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS Sobre las Normas Alimentarias, 2007). Para poder identificar las áreas de riesgo la planta generalmente se dividen en cuatro zonas según sus operaciones (Moreira, 2016).

Zona 1: áreas de la planta que son superficies de contacto directo del producto después de proceso de esterilización o proceso térmico y antes de que el producto sea empacado por ejemplo: cubetas, utensilios, manos de los empleados (si tocan el producto), contenedores, llenadoras (Almond Board of California, 2010).

Zona 2: áreas en donde no haya contacto con el producto en la planta y estén cercanas a superficies de contacto con el producto. Algunos ejemplos son: Estructuras de equipos, paneles de control y botones, tuberías aéreas que se encuentren directamente sobre las superficies de la Zona 1 y herramientas de mantenimiento (Almond Board of California, 2010).

ZONA 3: superficies que no tengan contacto con el producto y que se encuentren en áreas abiertas de procesamiento del producto posterior a la esterilización, pero no en las inmediaciones cercanas a las superficies de la Zona 1. Por ejemplo: Pisos, paredes, techos, mangueras, unidades de tratamiento del aire, bandejas para recoger el goteo de la condensación, carritos, montacargas, contenedores de basura, escobas, trapeadores y escurridores y cajas de herramientas (Almond Board of California, 2010).

Zona 4: áreas alejadas de las áreas de procesamiento del producto posterior a la esterilización, pueden originar una contaminación cruzada de las Zonas 1, 2 y 3. Algunos ejemplos son: pasillos, muelles de carga, depósitos en baños y vestidores, refrigeradores y congeladores, taller de mantenimiento y áreas de oficina (Almond Board of California, 2010).

En Paradise ingredients se divide la planta en diferentes zonas de higiene de acuerdo a los requerimientos de los diferentes procesos en zonas de baja, mediana y alta higiene.

La zona llenado de congelado y armado de se encuentran clasificados como zona de mediana higiene. Las zonas de baja higiene son la zona de descarga y recibo de banano, la zona de pre-proceso de banano, la zona de congelado (exceptuando llenado), la parte alta de los concentradores, la bodega de materia prima y la bodega de producto terminado (Master Plan Zoning Paradise Ingredients. Rev 8. 2019).

Con base en esta categoría se puede definir frecuencias y establecer un límite de control y acción para inspeccionar la correcta limpieza de esta zona.

Por otra parte la elección del método de muestreo va a depender del elemento que se quiera muestrear, se pueden utilizar esponjas o hisopos, muestras de trozos pequeños, muestras de polvo, muestras de agua y muestras de aire (Moreira, 2016).

### **Microorganismos patógenos *Salmonella sp* y *Listeria monocytogenes***

Algunos microorganismos contribuyen al deterioro de los alimentos, y otros se consideran patógenos porque causan enfermedades en quienes los consuman. Dos de estos microorganismos son *Listeria sp* y *Salmonella sp*.

*Listeria sp* es una bacteria oportunista, grampositiva y anaerobia facultativa, dentro de las especies patógenas se encuentra *Listeria monocytogenes*, un patógeno bacteriano intracelular causante de listeriosis en humanos (Codex Alimentarius , 1999).

Este microorganismo puede sobrevivir en biofilms durante períodos largos, a temperaturas de 10 a 45 °C siendo una temperatura óptima los 30 °C y pH de 4 y 9 (Velazquez, 2003). Es resistente a la salinidad o acidez alta, crece en condiciones de oxígeno bajo, también, sobrevive a períodos largos en el medio ambiente, en los alimentos, en la planta procesadora, y en la refrigeradora casera (Codex Alimentarius , 1999).

La temperatura y pH afecta la habilidad de *L.monocytogenes* para adherirse a superficies de contacto de alimentos como bandas y acero inoxidable, se puede evitar su proliferación

manteniendo un pH inferior a 4,4 y una actividad acuosa menor a 0,92 o la congelación ( Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS Sobre las Normas Alimentarias, 2007).

Es esencial mantener alimentos libres de *Listeria sp* porque una contaminación por *L. monocytogenes* causa listeriosis y se han reportaron aproximadamente 23.000 personas infectadas a nivel mundial para 2010, y de esa cifra 5.463 fallecieron (Jimenez, 2017).

La listeriosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más graves, hay de 0,1 a 10 casos anuales por millón de personas, dependiendo del país y la región. Aunque el número de casos es pequeño, la alta tasa de mortalidad de esta infección la convierte en un importante problema de salud pública (OMS, 2018).

Se han realizado varias investigaciones de la presencia de *Listeria sp* en diferentes alimentos como carnes crudas y productos cárnicos, pescado y leche obteniendo resultados positivos en algunos casos, concluyendo que los alimentos ricos en proteínas contienen diferentes especies de *Listeria* (Yehia, Ibraheim, & Hassanein, 2016).

En costa rica se ha detectado este microorganismo en alimentos frescos y de producción casera como quesos, leche sin pasteurizar, helados, pescados, entre otros, también, se puede contraer por el contacto con animales, personas infectadas, suelo o agua contaminada (Jimenez, 2017).

Existen dos tipos de listeriosis: la no invasiva, es una forma leve que afecta sobre todo a personas sanas. La forma invasiva, es más grave y afecta a determinados grupos de alto riesgo, como las embarazadas, los pacientes en tratamiento por cáncer, sida o trasplantes de órganos, los ancianos y los lactantes (OMS, 2018). Se presenta síntomas como diarrea leve, meningitis y septicemia (Codex Alimentarius , 1999).

Las cepas virulentas pueden invadir el epitelio gastrointestinal y entrar a las células fagocíticas donde pueden sobrevivir y reproducirse, puede llegar al cerebro y probablemente al feto en mujeres embarazadas. El periodo de incubación varía entre aproximadamente 2 días hasta 6 semanas (Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS Sobre las Normas Alimentarias, 2007).

Una de las cepas más virulentas es la Listeriolysin S (LLS), se asociada con la mayoría de brotes epidémicos a nivel mundial debido a que tiene la capacidad para generar una toxina que impide el crecimiento de los microorganismos benéficos alojados en el intestino humano para favorecer su propia reproducción. Se ha demostrado que *Listeria sp* utiliza un componente para sobrevivir llamado Hidrolasa de Sal Biliar (BSH), esta sustancia es liberada para resistir los efectos de las sales biliares del tracto intestinal (Jimenez, 2017).

Se ha detectado *Listeria sp* utilizando diferentes métodos, desde el tradicional hasta ensayos en tiempo real de PCR o amplificación isotérmica en diferentes matrices de alimentos y muestras de superficie (Cloke, Arizanova, Crabtree, Evan, & Simpson, 2016).



*Salmonella sp* es otro patógeno de importancia en la industria alimentaria, uno de los más importantes relacionados con la inocuidad de los alimentos (Qianru Yang, Domesle, & Fei Wang, 2016).

Se clasifica en el orden Enterobacteriales en la familia Enterobacteriaceae, son bacilos cortos gram-negativos no esporulados, anaerobios facultativos, oxidasa negativa, son móviles a excepción del serotipo *Gallinarum-Pullorum*. La temperatura de crecimiento está entre 7 °C a 48 °C, pH entre 4 a 8 y con actividades de agua por debajo de 0.93 (Alvarenga & Rodríguez de Álvarez, 2018).

Entre los serotipos más importantes se incluyen las serovariedades de tres únicas especies patógenas primarias: *S.typhi*, *S. choleraesuis* y *S. enteritidis* (Alvarenga & Rodríguez de Álvarez, 2018).

La enfermedad causada por este patógeno es salmonelosis, para causar enfermedad se necesita una inoculación entre 10 a 100 millones de este microorganismo, generalmente por un período entre 12 a 36 horas. En el caso de *S.typhi* el reservorio es el hombre por lo que su transmisión es de una persona a otra. Entre sus síntomas se encuentran diarrea, dolor abdominal, dolor de cabeza, fiebre, erupción máculo-papulosa en pecho y espalda; los enfermos presentan un período de convalecencia entre 1 y 8 semanas (Alvarenga & Rodríguez de Álvarez, 2018).

Una contaminación por *Salmonella* se produce debido al subproceso, contaminación cruzada post-tratamiento que proveniente de superficies de contacto del producto, manejo inadecuado, vectores como plagas, ingredientes contaminados, contaminación ambiental y tratamientos térmicos insuficientes (FSIS, 2017).

Los síntomas en la mayoría de los casos son relativamente leves y los pacientes se recuperan sin tratamiento específico, en el caso de niños pequeños y en ancianos, la deshidratación causada por la enfermedad puede agravarse y poner en peligro la vida (OMS, 2017)

La importancia de controlar este patógeno, es evitar contaminaciones transmitidas por alimentos, en Costa Rica se reportaron 210 casos para el 2015 (Ministerio de Salud, 2015), pero se estima que afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones (OMS, 2017).

En plantas de procesamiento como producción de harina, se ha encontrado presencia de *Salmonella* en pisos, muestras de polvo, zapatos de operarios, escobas, transportadores y otros lugares. Las plagas y roedores, aves, cucarachas y moscas pueden albergar y transmitir este microorganismo por lo cual, el manejo de plagas es de gran importancia (Aguilar, 2015).

### **Métodos para la detección de patógenos en alimentos**

La detección de patógenos en alimentos es de suma importancia. Mantener la inocuidad de los alimentos debe ser una de las prioridades de las industrias para evitar enfermedades que puedan causar sus productos.

Un alimento contaminado, puede significar la desacreditación de las empresas ante sus clientes y el público en general. Por esta razón, la importancia de establecer medidas que minimicen el riesgo que representan estos microorganismos y tener sistemas de gestión de calidad e inocuidad que permitan la pronta detección y control de patógenos (Almond Board of California, 2010).

Los laboratorios de microbiología al ver la creciente demanda de análisis de patógenos en alimentos han incluido estos análisis entre sus servicios. Los métodos de detección van desde los tradicionales hasta metodologías que utilizan tecnologías más rápidas como por ejemplo la detección de ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico ADN y ácido ribonucleico ARN) y biosensores, estos métodos son muy sensibles y específicos, además, dan resultados en períodos cortos (Huertas Caro, Urbano Cáceres, & Torres Caycedo, 2019).

Existen diferentes metodologías para la detección de patógenos en alimentos, estas metodologías se agrupan en métodos cualitativos o cuantitativos, dependiendo del método empleado se plantean los requisitos de validación.

### **Métodos cuantitativos**

La respuesta del análisis de estos métodos es la cantidad medida directamente o indirectamente (AOAC, 2012). Tienen límites operacionales y atributos como especificidad, sensibilidad, precisión, recuperación, límite de detección, linealidad y límite y rango de cuantificación, también algunos factores técnicos como la composición microbiana general de la muestra y el estrés de incubación (Camaró Sala, y otros, 2015).

### **Métodos cualitativos**

Este tipo de método tiene una respuesta de análisis de presencia o ausencia directa o indirectamente en determinada cantidad de muestra (AOAC, 2012). Se deben de tener en cuenta parámetros como sensibilidad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos y eficiencia (Camaró Sala, y otros, 2015).

### **Método tradicional**

El método tradicional de detección utiliza las características metabólicas para el aislamiento e identificación de microorganismos, teniendo presente la capacidad de los microorganismos de crecer en presencia de ciertos nutrientes, sales, químicos o antibióticos (Yáñez, 2015).

Estos métodos requieren de un enriquecimiento primario, enriquecimiento secundario, cultivo en agar y confirmación bioquímica (Yáñez, 2015). Generalmente son los métodos conocidos como métodos de referencia reconocido internacionalmente y ampliamente aceptados (Garrido, 2016).

### **Método molecular**

Los métodos moleculares se basan en la presencia de moléculas como el ADN que son específicas y se encuentran en un microorganismo o grupo de microorganismos. En este caso los pasos son un enriquecimiento primario y la detección molecular (Yáñez, 2015).

En el año 1952, A. Hershey y M. Chase mostraron que el ADN es el responsable de transmitir la información genética a la siguiente generación. Esta molécula es un polinucleótido de doble cadena, forma una doble hélice mantenida por interacciones no covalentes (Teijón & Gaitán, 2017).

El ADN es una molécula muy estable químicamente, está compuesto por bases púricas (adenina y guanina) y pirimidínicas (citosina y timina), y la desoxirribosa. Puede desnaturalizarse a causa de la rotura de los enlaces de hidrógeno y la alteración de las interacciones hidrofóbicas, esta desnaturalización ocurre en un rango de temperatura y pH específico, la temperatura de fusión varía linealmente entre 70-100 °C y cuando la temperatura desciende la cadena se aparea nuevamente (Teijón & Gaitán, 2017).

El método de PCR simula in vitro el proceso de la replicación del ADN, esta técnica permite la amplificación de un fragmento específico de ADN agregando oligonucleótidos que indican el sitio desde el cual debe iniciarse la amplificación y la ADN polimerasa. Cada ciclo de PCR tiene tres pasos: la desnaturalización en donde se calienta la reacción 90–94°C para romper los puentes de hidrógeno y separar la doble cadena de ADN, el alineamiento donde se disminuye la temperatura (50–65°C) y la extensión en la cual se eleva la temperatura (68–72°C) para que la polimerasa termoestable sintetice la nueva hebra de ADN (Peña, Ramírez & Barrera, 2013).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido muy utilizada debido a que la identificación de microorganismos se realiza de manera precisa y confiable. Mediante diferentes variantes de la PCR como: PCR en tiempo real, PCR cuantitativa, PCR de inmunocaptura, entre otros. Se han desarrollado varias técnicas de detección de microorganismos (Garrido, 2016).

Estas técnicas deben de tener sensibilidad, especificidad, bajo costo, simplicidad, rapidez, adaptabilidad a la temperatura y fácil disponibilidad de equipos (Garrido, 2016).

### **Sistema de detección Molecular 3M™**

El Sistema de detección Molecular (MDS) 3M™ se desarrolló a través de la combinación única de dos tecnologías: la amplificación isotérmica de ADN (LAMP) y la detección de bioluminiscencia, para amplificar rápidamente secuencias únicas de ácido nucleico de ADN con alta especificidad y sensibilidad (Yáñez, 2015). Esta efectividad se debe en gran parte a su diseño de primers que deben ser muy específicos y tiene una mayor tolerancia a inhibidores (rapidmicrobiology, 2019).

El método utiliza una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena, una amplificación por desplazamiento no requiere el paso de PCR donde hay que desnaturalizar (90°C), es isotérmica por lo tanto la reacción ocurre a una misma temperatura de 60°C en forma continua, además, tiene una alta eficiencia de amplificación ya que el ADN se amplifica 109 – 1010 veces en 15 a 75 minutos (rapidmicrobiology, 2019).

El método LAMP, es llevado a cabo por una polimerasa con alta actividad de desplazamiento de cadena y un sistema de dos cebadores internos y dos cebadores externos para reconocer un total de seis secuencias distintas en el ADN blanco garantizando alta especificidad; se han desarrollado

varios métodos para la identificación de virus, bacterias, protozoos y hongos (Arroyo , Morales, Sosa , & Carmona-Fonseca, 2008).

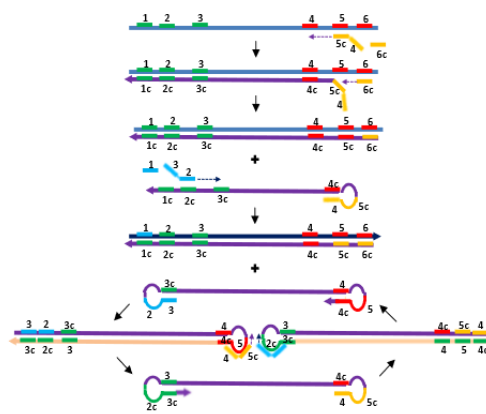
Cuando se completa un ciclo de la reacción, solo los cebadores internos son usados para la síntesis de ADN, se denominan Forward Inner Primer (FIP) y Backward Inner Primer (BIP), cada uno contiene dos secuencias distintas que corresponden a las secuencias sentido y anti-sentido del ADN blanco, uno para cebar en la primera etapa y el otro para auto-cebarse en etapas posteriores (Arroyo , Morales, Sosa , & Carmona-Fonseca, 2008).

La reacción de LAMP se inicia por la adición de un fragmento considerable de ADN polimerasa Bst ( *Bacillus stearothermophilus* ) y es llevada a 65°C durante una hora (Arroyo , Morales, Sosa , & Carmona-Fonseca, 2008).

El cebador interno FIP se une a F2c en el ADN blanco e inicia la síntesis de la hebra complementaria. El cebador externo F3, que es unas pocas bases más cortas; está en menor concentración que FIP; lentamente se une a F3c en el ADN blanco e inicia la síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra (Arroyo , Morales, Sosa , & Carmona-Fonseca, 2008).

Al liberar una cadena complementaria unida a FIP, se forma una estructura enrollada (bucle) en un extremo (figura 2). Esta hebra sencilla de ADN sirve como molde para la síntesis de ADN iniciada por BIP y la subsiguiente síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra a partir del cebador B3, originando la producción de un ADN en forma de doble asa (dumb-bell ), que es rápidamente convertida a una forma de bucle en tallo ( stem loop ) por la síntesis de ADN del autocebador, luego, esta forma sirve de inicio para los ciclos de LAMP (Arroyo , Morales, Sosa , & Carmona-Fonseca, 2008).

**Figura 2:** Amplificación Isotérmica de ADN (LAMP).



Fuente: Yáñez, 2015.

Para iniciar los ciclos de LAMP, FIP se une a la estructura en herradura de ADN y se inicia la síntesis por desplazamiento de la hebra, lo que genera una separación intermedia en la estructura en herradura de ADN con una copia invertida adicional de la secuencia blanco en la base y un asa o bucle formada en el extremo opuesto a través de la elongación y reciclaje.

Así, la secuencia original de LAMP es amplificada tres veces cada medio ciclo, los productos finales son una mezcla de ADN en herradura con diferentes longitudes y estructuras, con múltiples bucles formados por la unión entre repeticiones invertidas alternativas de la secuencia blanco en la misma cadena (Arroyo , Morales, Sosa , & Carmona-Fonseca, 2008).

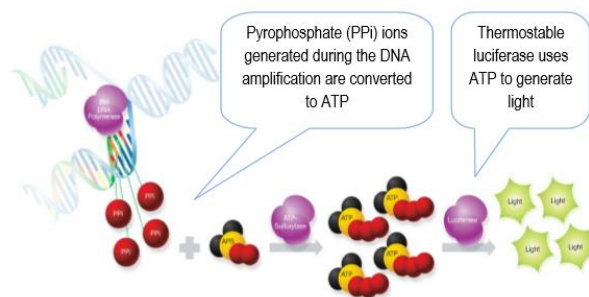
La amplificación isotérmica de ADN (LAMP) es una técnica de amplificación de ácidos nucleicos altamente robusta, eficiente, sensible, específica y sencilla. La ventaja que representa es un resultado en un menor tiempo ya que, se realizan entre 35 y 60 minutos, y no requiere desnaturalización, tiene una menor complejidad y menor costo en comparación con los métodos de PCR (Yáñez, 2015).

Esta técnica permite la visualización de los resultados positivos a simple vista y puede ser visualizado con una fuente de luz ultravioleta (UV), añadiendo un colorante de fluorescencia en la mezcla de la reacción (Arroyo , Morales, Sosa , & Carmona-Fonseca, 2008).

La tecnología de bioluminiscencia se utiliza para reportar la amplificación del ADN del organismo objetivo en tiempo real, es un proceso enzimático de dos pasos (Figura 3), las moléculas de pirofosfato generadas durante la amplificación del ADN se convierten en ATP, este es utilizado por luciferasa de luciérnaga termoestable para generar luz que es emitida y leída por el Instrumento de Detección Molecular 3M™ y señala la detección (Yáñez, 2015).

Para resultados positivos se informarán en tiempo real mientras que los resultados negativos e inspección se mostrarán después de que se complete la ejecución (Yáñez, 2015).

**Figura 3.** Proceso enzimático de Detección Molecular 3M™ (1. Los iones de pirofosfato generados durante la amplificación de ADN son convertidos a ATP 2. el ATP utiliza la luciferasa termoestable para generar luz).



Fuente: Yáñez, 2015.

Para patógenos como *Salmonella* y *L. monocytogenes* se utiliza este método para la detección rápida y específica de estos microorganismos en matrices de alimentos y muestras ambientales que son previamente enriquecidas en un medio adecuado (Yáñez, 2015).

Este método ha sido evaluado, comparándolo con métodos de referencia ISO, USDA, FDA o AOAC con una amplia gama de matrices, además, se ha evaluado su rendimiento mediante pruebas de inclusión y la exclusividad (Yáñez, 2015).

Las pruebas inclusividad se realizan para, conocer la capacidad de un método para detectar el analito objetivo de una amplia gama de cepas. Las pruebas de exclusividad permiten ver la falta de interferencia de un rango relevante de cepas no diana, el estudio de comparación de métodos internos se realiza para evaluar el rendimiento del método 3M en comparación con el método de referencia ISO 6579 (Yáñez, 2015).

Esta técnica fue comparada por 13 laboratorios ubicados en los Estados Unidos y Canadá con el método de referencia para la detección de *L. monocytogenes* en pavo y filete de pechuga de pollo crudo (Bird, Flannery, Crowley, Agin, & Goins, 2017).

Para la detección rápida de *Salmonella* en varios tipos de muestras de alimentos, se utiliza el acoplamiento de la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) con bioluminiscencia en tiempo real, siendo métodos rápidos, específicos, sensibles, cuantitativos y robustos (Qianru Yang, Domesle, & Fei Wang, 2016).

El método 3M MDA 2 – *Salmonella* se ha comparado con método de referencia en diferentes matrices sin mostrar una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Bird, Flannery, Crowley, Agin, & Goins, 2016).

### **Validación de métodos microbiológicos**

Una validación es un proceso, donde se establece que las características de desempeño de un método están de acuerdo con los requerimientos para una determinada aplicación. Cuando un método ya está validado, el laboratorio tendrá que demostrar periódicamente el buen desempeño del método (Lazos Martínez & Hernández Gutiérrez, 2004).

Al realizar una validación se deben de definir el tipo de método que se va a validar y los rangos para los parámetros, además, de como se realizará la toma de muestras y cuáles cepas de referencia se van a utilizar (Camaró Sala, y otros, 2015).

Incluyen también precisión, exactitud, sensibilidad, especificidad, rango de resultados y límite de detección o cuantificación (Camaró Sala, y otros, 2015).

Se tiene que establecer las condiciones en que se va a aplicar el método y finalmente comprobar el cumplimiento de requisitos y declarar la validez del método. Por está razón se establecen las etapas del proceso de validación (Lazos Martínez & Hernández Gutiérrez, 2004).

Estas etapas comprenden: Conocer el problema a resolver de acuerdo a las características del método, las necesidades del laboratorio y del solicitante de la prueba. Planificar las acciones a seguir, los requisitos y condiciones a cumplir, establecer el diseño experimental y los análisis de resultados estadísticamente válidos (Camaró Sala, y otros, 2015).

Se debe de definir el alcance de la validación, especificar la muestra en la que se va a aplicar, temperatura, tiempo de incubación, límites de operación y describir los microorganismos de interés. Finalmente después de realizar la validación y evaluar los resultados obtenidos, se debe de confirmar la validez del procedimiento utilizado y realizar el informe de validación (Camaró Sala, y otros, 2015).

La validación parcial o verificación debe reflejar las condiciones reales del ensayo. Se pueden utilizar muestras contaminadas natural o inoculadas con un nivel conocido del microorganismo, se debe ser conciente de que la inoculación de una matriz solo imita la presencia natural de microorganismos contaminantes (Camaró Sala, y otros, 2015).

Para realizar una validación se deben estimar los niveles de contaminación de muestras ya sea que se esta contaminación sea natural y/o artificial (Qvist , 2011).

La importancia de la validación es que es uno de los principales requisitos de calidad, ha ido aumentando debido a la comprensión del rendimiento de los métodos rápidos (Qvist , 2011).

Un laboratorio, cuando desarrolla un método o utiliza uno desarrollado por alguien más, debe asegurar que es adecuado para la función o el uso previsto declarando su validez (Lazos Martínez & Hernández Gutiérrez, 2004).

Una validación se pueden realizar para estos tipos de métodos y comprenden dos fases. La fase A, es un estudio comparativo realizado por un laboratorio experto del método alternativo frente a un método de referencia (Qvist , 2011).

La fase B es un estudio colaborativo del método alternativo que se lleva a cabo en un ensayo organizado por el mismo laboratorio experto (Qvist , 2011).

Una validación primaria se realiza como un proceso exploratorio, en el cuál se busca realizar una caracterización de una técnica que se desarrolla en un laboratorio, se deben establecer los límites operacionales, desempeño del método nuevo, dar origen a especificaciones numéricas y descriptivas (Camaró Sala, y otros, 2015).

La validación secundaria, revalidación o verificación, se realiza cuando un laboratorio implementa un método desarrollado en otra parte, se deben aportar pruebas que establece que se cumplen con los requisitos del método empleado (Camaró Sala, y otros, 2015).

Para métodos cualitativos las validaciones pretenden demostrar que los microorganismos no influyen en la desviación positiva (ocurre cuando un método alternativo da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia negativo) o desviación negativa (cuando un método alternativo da resultado negativo sin confirmación y el de referencia da positivo) (Fortes; David; Koeritzer; Wiedmann, 2013).

## Objetivos

### *Objetivo General*

Validar el Sistema de Detección Molecular 3M™ para la Detección de *Listeria sp* y *Salmonella sp* en muestras de Puré de Banano Congelado y medio ambiente en la empresa Paradise Ingredients

### *Objetivos específicos*

I Comprobar mediante la validación, si el Sistema de Detección Molecular 3M™ para la detección de patógenos, es apropiado para analizar alimentos y medio ambiente de la empresa Paradise Ingredients

II Determinar si existen puntos de muestreo ambiental vulnerables en la línea de banano congelado para presencia de *Listeria sp* y *Salmonella sp*



## Materiales y Métodos

### Localización del estudio

Las actividades de producción se desarrollaron en la planta de alimentos Paradise Ingredients, en la línea de puré de banano congelado ubicada en Cartago, Costa Rica. Las actividades experimentales se realizaron en los laboratorios de docencia del Instituto Tecnológico de Costa Rica y en el Laboratorio Central de la empresa Paradise Ingredients

### Protocolo de validación para métodos cualitativos

El protocolo de validación que se utilizó fue para métodos cualitativos donde se evaluó el método alternativo utilizando el MDS 3M™ frente al método de referencia en el laboratorio externo MICROTEC donde utilizaron los métodos BAM C10 para *Listeria monocytogenes* y BAM C5 para *Salmonella sp.*

### Matrices

Se utilizaron muestras de puré de banano congelado y superficies 50% contaminadas artificialmente y otro 50% negativos. Se utilizaron dos cepas para la contaminación artificial; *L. monocytogenes* ATCC 7644 y *S. enterica* sv *Typhimurium* ATCC14028.

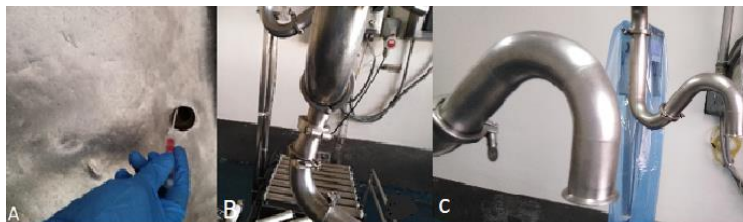
### Muestreo de producto terminado

Se obtuvieron muestras de banano congelado concentrado, se tomaron directamente de la cachera de llenado, por duplicado en bolsas de 500gr de tres lotes diferentes, una muestra de cada lote se envió a analizar previamente para *Salmonella sp* y *Listeria sp* a un laboratorio externo para garantizar que estén libres de estos microorganismos. Las muestras se mantuvieron a -18 °C hasta su análisis.

### Muestreo de superficies

Se tomaron muestras de superficies en tres puntos de la línea de banano congelado por duplicado para cada microorganismo, estas superficies fueron drenaje de pila, tubería previo a cachera de llenado y las cacheras de llenado (figura 4), las áreas se desinfectaron previamente con alcohol de 70 para asegurar que este libre de microorganismos. Se utilizó la técnica de hisopado utilizando un hisopo 3M™ QuickSwab con 1 ml de caldo Letheen, se frotó por la superficie en un área de aproximadamente 10 cm x 10 cm.

**Figura 4. Puntos de línea congelado para validación.**



**(A. drenaje; B. Tubería antes llenado; C. Cacheras de llenado).**

## Diseño experimental

Se trabajó con un diseño factorial tipo 2 a la 3 que consta de 24 ensayos, con 3 bloques, se tienen 3 lotes y tres puntos de muestreo (Chicas, 2019).

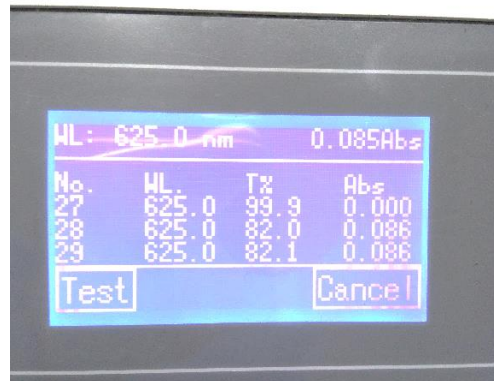
## Preparación del inóculo

Las cepas *L. monocytogenes* ATCC 7644 y *S. enterica* sv *Typhimurium* ATCC14028 se sembraron por extensión en agar Trypticase soya (TSA) preparado previamente y se incubaron a 37°C por 24 h, siguiendo las instrucciones del fabricante.

De las placas obtenidas, se tomó una muestra con un hisopo estéril y se introdujo en un tubo de ensayo con 9 ml de solución salina estéril al 0.085% y se agitaron para homogenizar.

Se utilizó un espectrofotómetro X-ma 1200 a 625 nm para medir y ajustar la absorbancia entre 0.07 a 0.08 (figura 5).

**Figura 5. Absorbancia de muestras a 625 nm.**



Posteriormente, se realizaron diluciones decimales traspasando 1 ml de cada tubo a otro que contenía 9 ml de agua peptonada. Se realizó este procedimiento hasta llegar a las diluciones necesarias para cada metodología. Las diluciones  $10^2$ ,  $10^1$ , 1:2 y 1:5 se sembraron en profundidad por triplicado en agar para recuento en placa, se incubaron a 37°C por 24 horas.

## Contaminación artificial de las muestras

Para el análisis cualitativo se pesaron 100g de muestra de puré de banano congelado por duplicado para cada microorganismo y cada una se contaminaron con 1 mililitro de un inóculo de  $10^1$  que corresponde entre 10 -50 UFC/ml. Para las superficies a una muestra de cada punto se agregó 1 mililitro de un inóculo  $10^1$  al hisopo con 10ml de agua peptonada buferizada ISO para *S. enterica* y 10ml de demi fraser para *L. monocytogenes*.

Para la detección de *Salmonella sp* se realizó una segunda contaminación de muestras, para cada lote de puré de banano congelado se pesaron 25gr y se descongelaron y mantuvieron a temperatura ambiente por dos horas, posteriormente se contaminaron con 1ml del inóculo de *S. entérica*.

Las muestras que no se contaminaron solo se pesaron (puré banano congelado) y rotularon para ser analizadas posteriormente.

Se envió una muestra contaminada de cada lote de puré de banano congelado y una muestra de cada superficie contaminada a laboratorio MICROTEC, las muestras se enviaron en hielera con gelpacks. También se envió una muestra de cada lote de puré de banano congelado y una muestra de cada superficie sin contaminar al laboratorio MICROTEC para ser analizada para *Salmonella sp* y *Listeria sp*.

Las muestras de puré de banano congelado se guardaron en congelación a -18 °C por tres semanas, después se analizaron por ambos métodos nuevamente.

### **Detección molecular de *S. enterica sv Typhimurium***

Para el enriquecimiento se utilizó agua peptonada buferizada ISO la cuál se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente para cada muestra se pesaron 25 g de puré de banano en una bolsa estéril y se agregaron 225 ml de agua peptonada buferizada ISO y se homogenizó. Para las muestras ambientales se colocó el hisopo en 10 ml de agua peptonada buferizada ISO a 37°C y se homogenizó. Las muestras se incubaron a 41,5°C por 24h.

El análisis molecular se realizó con el equipo detección Molecular (MDS) 3M™ y el el 3M Kit *Salmonella* Versión 2. En cámara de flujo laminar se limpiaron los instrumentos del equipo hipoclorito de sodio al 3%.

Se procedió a invertir los tubos de Solución de Lisis (SL) previamente ambientados, para cada muestra se transfirieron 20 µL al tubo de lisis. Posteriormente se colocaron los tubos en el bloque a 100°C (±1°C) por 15 minutos. Después de transcurrido el tiempo se colocaron en el bloque frío a temperatura ambiente (20-25°C) por 5 minutos.

Se tomaron 20 µL de la muestra y se transfirió al tubo de reactivo individual, pipeteando 5 veces para mezclar. Seguido colocaron los tubos cerrados en la bandeja de carga rápida. Se Incorporaron los datos de las muestras al software y finalmente se inició la ejecución en el software.

### **Detección molecular de *Listeria sp***

Para el enriquecimiento se utilizó agua medio demi fraser suplementado, el cual se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente para cada muestra se pesaron 25 g de puré de banano en una bolsa estéril y se agregaron 225 mL de demi fraser y se homogenizó. Para las muestras ambientales se colocó el hisopo en 10 ml de demi fraser y se homogenizó. Las muestras se incubaron a 37°C por 24h.

El análisis molecular se realizó con el equipo detección Molecular (MDS) 3M™ y el el 3M Kit *Listeria* Versión 2. En cámara de flujo laminar se limpiaron los instrumentos del equipo con hipoclorito de sodio al 3%.

Se procedió a invertir los tubos de Solución de Lisis (SL) previamente ambientados, para cada muestra se transfirieron 20 µL al tubo de lisis. Posteriormente se colocaron los tubos en el bloque a

100°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) por 15 minutos. Después de transcurrido el tiempo se colocaron en el bloque frío a temperatura ambiente (20-25°C) por 5 minutos.

Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de la muestra y se transfirió al tubo de reactivo individual, pipeteando 5 veces para mezclar. Seguido colocaron los tubos cerrados en la bandeja de carga rápida. Se Incorporaron los datos de las muestras al software y finalmente se inició la ejecución en el software.

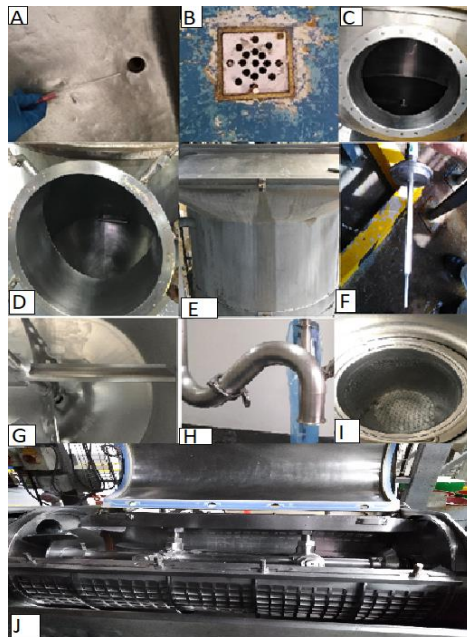
Para las muestras de puré de banano congelado, las muestras inoculadas y sin inocular se congelaron  $-18^\circ\text{C}$  por 3 semanas y se analizaron nuevamente para evaluar la recuperación de los microorganismos presentes.

### Muestreo de superficies en la línea de banano congelado

Para el muestreo de superficies se utilizó el diagrama de flujo de la línea de banano congelado y el Master Plan Zoning 2019 de Paradise Ingredients para determinar los puntos vulnerables de la línea, se utilizó la técnica de hisopado, con un hisopo 3M™ QuickSwab con 1 ml de caldo Lethen. Posteriormente se prepararon las muestras y se corrieron en el el equipo detección Molecular (MDS) 3M™.

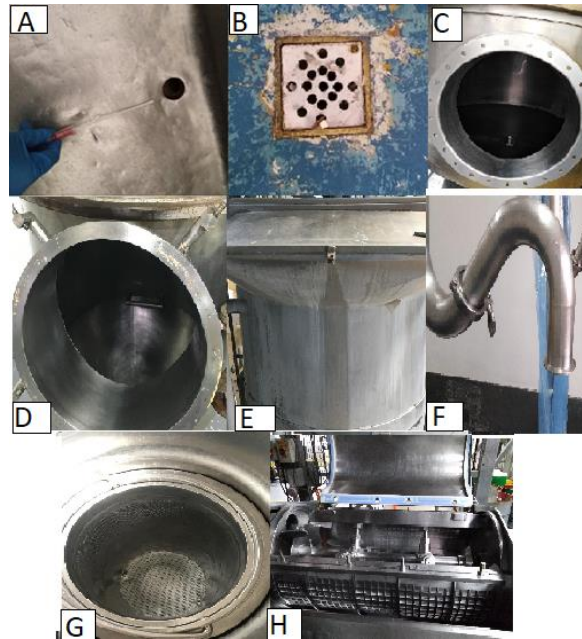
Los puntos muestreados se observan en en la figura 6 Y 7; además, para *Listeria sp* se tomaron muestras en las cámaras de congelación 5, 6 y 7 y en la antecámara.

**Figura 6.** Puntos de muestreo para *Listeria sp*.



(A. drenaje pila; B. drenaje de piso; C. Tanque almacenamiento Rodger; D. Tanque Flash desaireado; E. Tanque nivel de almacenamiento; F. Termocupa de termos de enfriamiento; G. Tanque frío de almacenamiento; H. Cacheras de llenado; I. Filtro PPRO; J. Filtros FMC).

**Figura 7.** Puntos de muestreo para *Salmonella sp.*



(A. drenaje pila; B. drenaje de piso; C. Tanque almacenamiento Rodger; D. Tanque Flash desaireado; E. Tanque nivel de almacenamiento; F. Cacheras de llenado; G. Filtro PPRO; H. Filtro FMC).

### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el software estadístico Minitab 2019 para realizar la prueba exacta de Fisher, además, se calculó la desviación estándar y la media del inóculo.

Se calcularon la sensibilidad, exactitud relativa, especificidad, tasa falsos positivos, tasa falsos negativos, concordancia Kappa utilizando la tabla de la figura 8.

**Figura 8.** Expresión de cálculos para parámetros de validación.

**Parámetros de validación y expresiones para su cálculo**

Sensibilidad	Sensibilidad = $\frac{VP}{VP + FN}$	Expresada como %	Sensibilidad % = $\frac{VP}{VP + FN} \times 100$
Especificidad	Especificidad = $\frac{VN}{VN + FP}$	Expresada como %	Especificidad % = $\frac{VN}{VN + FP} \times 100$
Exactitud relativa	Exactitud relativa = $\frac{VP+VN}{VP+FP+VN+FN} \times 100$		
Tasa de Falsos Positivos	Tasa Falsos Positivos = $\frac{FP}{FP+VN} = 1 - \text{Especificidad}$ Expresado en % Falsos Positivos % = $\frac{FP}{FP+VN} \times 100 = 100 - \text{Especificidad}$		
Tasa de Falsos Negativos	Tasa Falsos Negativos = $\frac{FN}{FN+VP} = 1 - \text{Sensibilidad}$ Expresado en % Falsos Negativos % = $\frac{FN}{FN+VP} \times 100 = 100 - \text{Sensibilidad}$		
Concordancia estadística para métodos cualitativos	Índice de concordancia Kappa $\text{Kappa} = \frac{2(VP \times VN - FN \times FP)}{[(VP+FP)(FP+VN) + (VP+FN)(FN+VN)]}$		

FP: falsos positivos    FN: falsos negativos    VN: verdaderos negativos    VP: verdaderos positivos

**Tabla de contingencias**

Respuesta	Muestra inoculada	Muestra no inoculada
<b>Resultado Positivo</b>	Verdadero positivo (VP)	Falso Positivo (FP)
<b>Resultado Negativo</b>	Falso negativo (FN)	Verdadero Negativo (VN)

**Fuente:** Organismo Argentino de Acreditación, 2013.

## Resultados

### 1. Preparación del inóculo

Para corroborar la concentración de las diluciones realizadas se utilizó la técnica por vertido en placa en un agar no selectivo, en este caso Plate Count agar. Se escogió la dilución  $10^1$  (cuadro 1) con las cuales se obtuvieron las medias correspondientes a 21 y 29 UFC/ml, se determinó como la dilución adecuada para la contaminación artificial de muestras ya que no es más de 10 veces el límite de detección del método MDS 3M™.

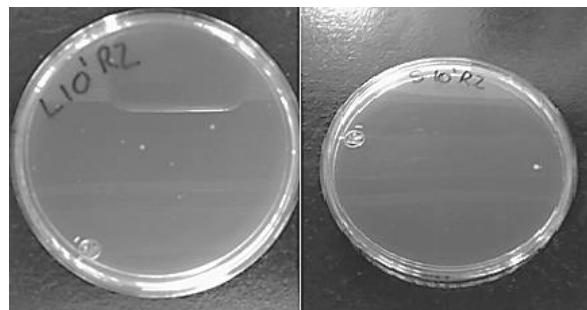
**Cuadro 1.** Concentración del inóculo.

Repeticiones	<i>S. enterica sv Typhimurium</i> (UFC/ml)	<i>Listeria monocytogenes</i> (UFC/ml)
1	80	70
2	10	0
3	0	0
4	20	10
5	0	30
6	0	30
7	10	30
8	90	40
9	50	10
10	0	30
11	0	10
12	0	30
Media	21.67	29
Desviación estándar	32.98	17.92

Fuente: Minitab 2019.

En la figura 9 se puede observar el crecimiento de una colonia para *S. enterica sv Typhimurium* equivalente a 10 UFC/ml y dos colonias para *Listeria monocytogenes* equivalente a 20 UFC/ml.

**Figura 9.** Cultivo por vertido en placa de dilución  $10^1$ .



(Izquierda: *Listeria monocytogenes*; derecha: *S. enterica sv Typhimurium*).

## 2. Detección molecular de *Listeria sp* en muestras de puré de banano congelado y superficies

Los resultados obtenidos para el método molecular y el método tradicional fueron iguales para ambos métodos (cuadro 2).

**Cuadro 2.** Resultados obtenidos para *Listeria sp*.

Código de Muestra	Carga	Tipo de muestra	Resultado MDS 3M™	Método tradicional
LICIL	Inoculada	Puré de banano	Positivo	Positivo
L2CIL		Puré de banano	Positivo	Positivo
L3CIL		Puré de banano	Positivo	Positivo
PICIL		Superficie	Positivo	Positivo
P2CIL		Superficie	Positivo	Positivo
P3CIL		Superficie	Positivo	Positivo
LISIL	Sin inocular	Puré de banano	Negativo	Negativo
L2SIL		Puré de banano	Negativo	Negativo
L3SIL		Puré de banano	Negativo	Negativo
PISIL		Superficie	Negativo	Negativo
P2SIL		Superficie	Negativo	Negativo
P3SIL		Superficie	Negativo	Negativo

Los resultados obtenidos para la sensibilidad, exactitud relativa, especificidad, tasa falsos positivos, tasa falsos negativos, evidencian la detección de muestras contaminadas, y resultados negativos de muestras no contaminadas en ambos métodos, con tres semanas de congelación los resultados se ven afectados debido a que no se logró detectar todos los positivos por el método molecular (cuadro 3).

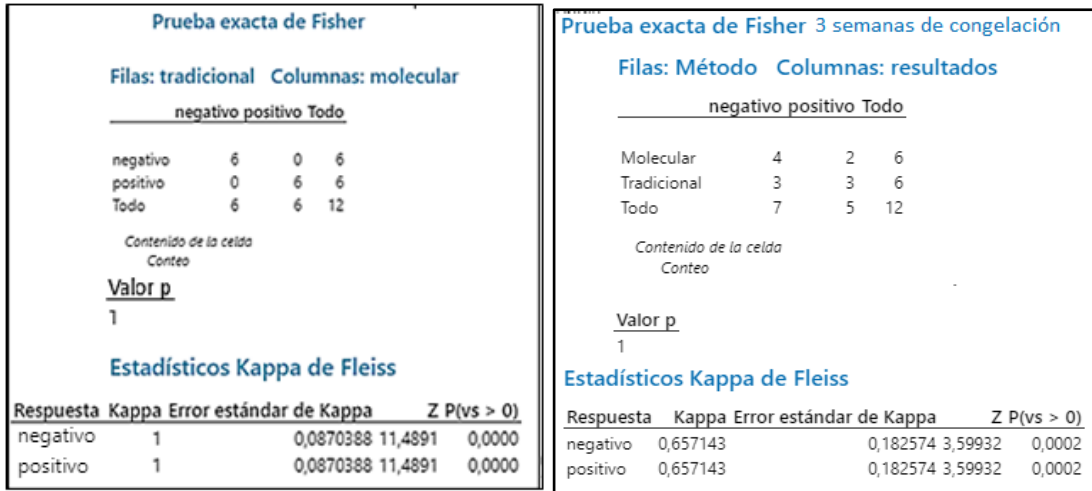
**Cuadro 3.** Resultados estadísticos para *Listeria sp*.

Muestras	Sensibilidad %	Especificidad %	Exactitud relativa %	Tasa falsos positivos %	Tasa falsos negativos %
Puré de banano y superficies	100	100	100	0	0
Puré de banano con 3 semanas de congelación	83	100	92	0	17

La prueba exacta de Fisher produce un valor p de 1, debido a que el valor de  $p > 0.05$  no se puede rechazar la hipótesis nula. Por lo tanto, con estos datos, no hay evidencia suficiente para indicar una diferencia entre los métodos, y el índice concordancia Kappa igual a 1 que muestra una concordancia perfecta (figura 10).



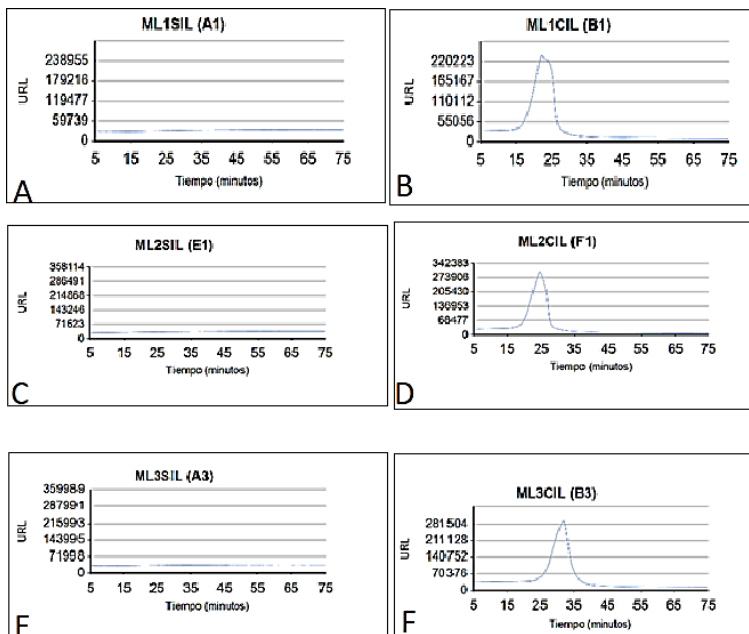
**Figura 10. Resultados prueba exacta de Fisher y análisis Kappa de Fleiss para *Listeria sp* y resultados de muestras con tres semanas de congelación.**



Fuente: Minitab, 2019.

En los gráficos obtenidos del MDS 3M™ para cada análisis muestran picos medidos en RLU (unidades relativas de luz) significan que si hubo una amplificación de ADN por lo que estas muestras son positivas (figura 11).

**Figura 11. Resultados obtenidos para puré de banano *Listeria sp*.**

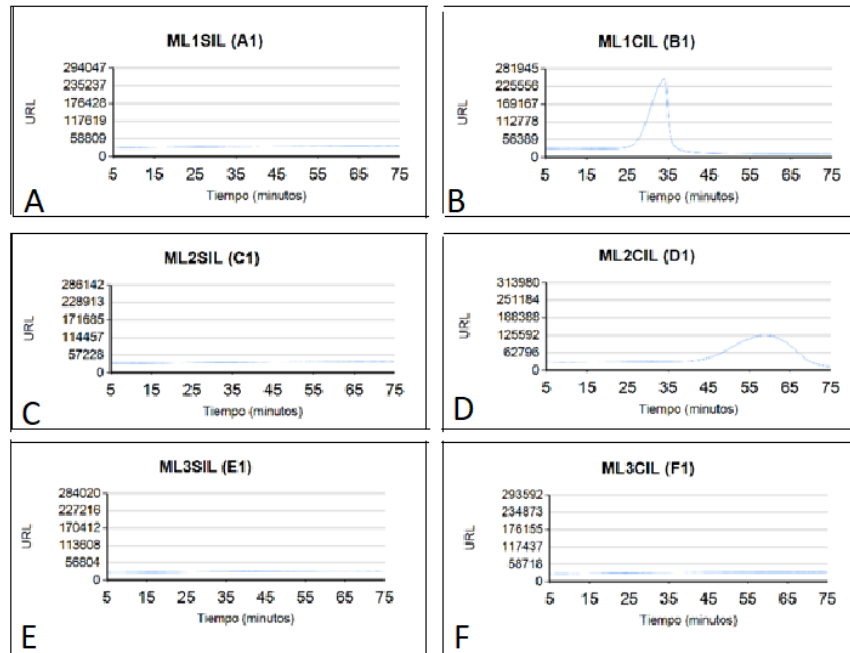


(A. Lote 1 con sin inóculo; B. Lote 1 con inóculo; C. Lote 2 sin inóculo; D. Lote 2 con inóculo; E. Lote 3 sin inóculo; F. Lote 3 con inóculo).

Después de 3 semanas de congelación las muestras de puré de banano congelado con el método molecular dieron resultados positivos con el método MDS 3M™ en dos lotes contaminados el

método tradicional detectó los tres lotes contaminados como positivos lo cual afectó la sensibilidad de método MDS 3M™ (figura 12).

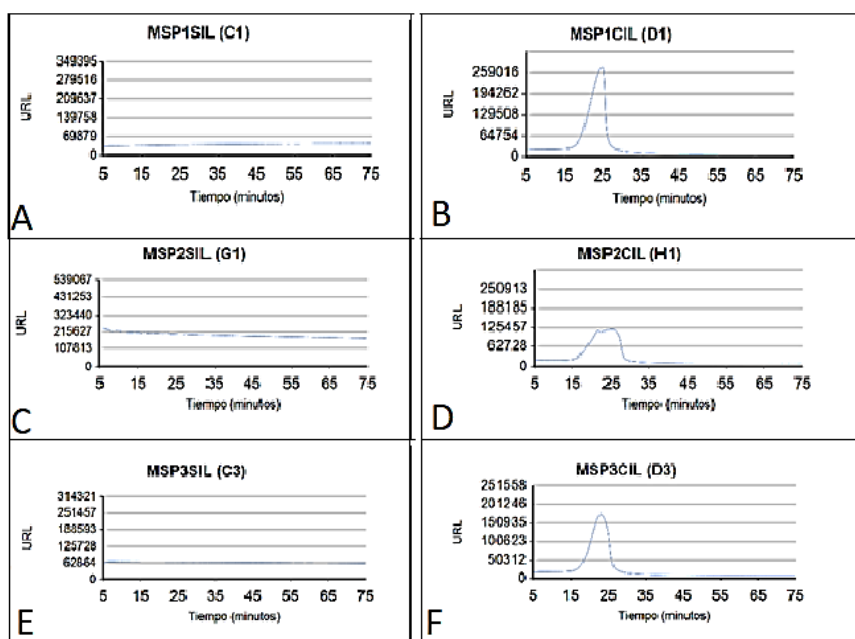
**Figura 12. Resultados obtenidos para puré de banano *Listeria sp* con tres semanas de congelación.**



(A. Lote 1 con sin inóculo; B. Lote 1 con inóculo; C. Lote 2 sin inóculo; D. Lote 2 con inóculo; E. Lote 3 sin inóculo; F. Lote 3 con inóculo).

En la figura 13 se observan los gráficos obtenidos del MDS 3M™ para cada muestra analizada de superficies. Las muestras con picos medidos en RLU (unidades relativas de luz) significan que si hubo una amplificación de ADN por lo que estas muestras son positivas.

**Figura 13. Resultados obtenidos para superficies *Listeria sp***



( A.Cachera de llenado sin inóculo; B. Cachera de llenado con inóculo; C.drenaje sin inóculo; D. Drenaje con inóculo; E. Tubería sin inóculo; F. tubería con inóculo).

### 3. Detección molecular de *S. enterica sv Typhimurium* en muestras de puré de banano congelado y superficies

En el cuadro 4 se observan los resultados obtenidos para el método molecular y el método tradicional.

**Cuadro 4. Resultados obtenidos para *Salmonella sp.***

Muestra	Carga	Muestra	Resultado MDS 3M™	Método tradicional
LICIS	Inoculada	Puré de banano	Negativo	Positivo
L2CIS		Puré de banano	Negativo	Positivo
L3CIS		Puré de banano	Negativo	Positivo
PICIS		Superficie	Positivo	Positivo
P2CIS		Superficie	Positivo	Positivo
P3CIS		Superficie	Positivo	Positivo
LISIS	Sin inocular	Puré de banano	Negativo	Negativo
L2SIS		Puré de banano	Negativo	Negativo
L3SIS		Puré de banano	Negativo	Negativo
PISIS		Superficie	Negativo	Negativo
P2SIS		Superficie	Negativo	Negativo
P3SIS		Superficie	Negativo	Negativo

Los resultados obtenidos de la sensibilidad, exactitud relativa, especificidad, tasa falsos positivos y tasa falsos negativos, muestran sensibilidad de 75%, una tasa de falsos negativos de 25% debido a que no se detectó positivos para muestras de puré con inoculadas con el patógeno en el método molecular. Las muestras congeladas después de 3 semanas no mostraron positivos en ningún método evaluado, mostrando valor de 100% para falsos negativos (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Resultados estadísticos para *Salmonella sp.*

Muestras	Sensibilidad %	Especificidad%	Exactitud relativa %	Tasa falsos positivos%	Tasa falsos negativos %
Puré de banano y superficies	75	80	88	0	25
Puré de banano con 3 semanas de congelación	0	100	50	0	100

La prueba exacta de Fisher dio un valor p de 0,40. El índice de concordancia Kappa de 0.5 muestra una concordancia moderada, para muestras con tres semanas de congelación no se puede calcular la prueba exacta de Fisher ni kappa debido a que todos los resultados fueron negativos (figura 14).

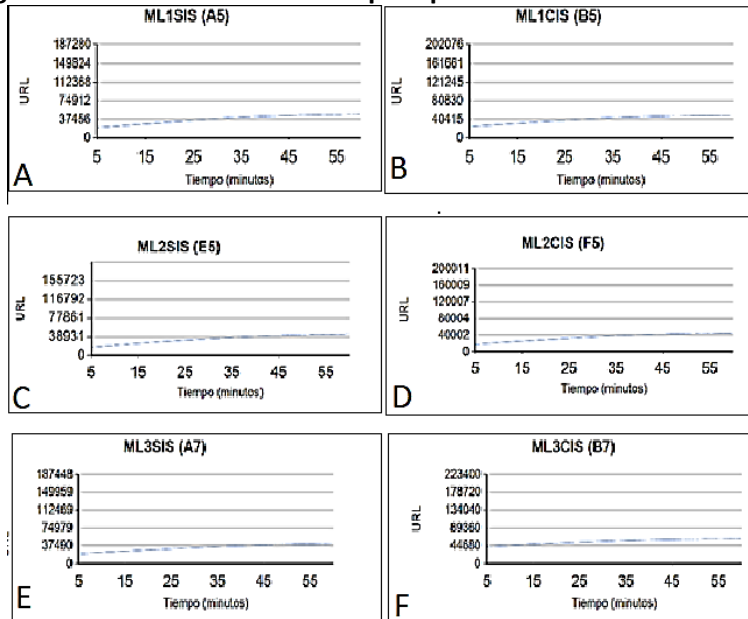
**Figura 14.** Resultados prueba exacta de Fisher para *Salmonella sp sp* y resultados de muestras con tres semanas de congelación.

<p align="center"><b>Prueba exacta de Fisher</b></p> <p>Filas: Método Columnas: resultados</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>negativo</th> <th>positivo</th> <th>Todo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Molecular</td> <td>9</td> <td>3</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>Tradicional</td> <td>6</td> <td>6</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>Todo</td> <td>15</td> <td>9</td> <td>24</td> </tr> </tbody> </table> <p>Contenido de la celda Conteo</p> <p>Valor p 0,400323</p> <p align="center"><b>Estadísticos Kappa de Fleiss</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Respuesta</th> <th>Kappa</th> <th>Error estándar de Kappa</th> <th>Z</th> <th>P(vs &gt; 0)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>negativo</td> <td>0,563636</td> <td>0,0870388</td> <td>6,47569</td> <td>0,0000</td> </tr> <tr> <td>positivo</td> <td>0,563636</td> <td>0,0870388</td> <td>6,47569</td> <td>0,0000</td> </tr> </tbody> </table>						negativo	positivo	Todo	Molecular	9	3	12	Tradicional	6	6	12	Todo	15	9	24	Respuesta	Kappa	Error estándar de Kappa	Z	P(vs > 0)	negativo	0,563636	0,0870388	6,47569	0,0000	positivo	0,563636	0,0870388	6,47569	0,0000	<p align="center"><b>Muestras con 3 semanas de congelación</b></p> <p>Filas: Método Columnas: resultados</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>negativo</th> <th>Todo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Molecular</td> <td>6</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Tradicional</td> <td>6</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Todo</td> <td>12</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table> <p>Contenido de la celda Conteo</p> <p align="center"><b>Estadísticos Kappa de Fleiss</b></p> <p>Evaluaciones idénticas. No se puede calcular kappa.</p> <p>La prueba exacta de Fisher sólo está disponible para las tablas de 2 x 2.</p>						negativo	Todo	Molecular	6	6	Tradicional	6	6	Todo	12	12
	negativo	positivo	Todo																																																	
Molecular	9	3	12																																																	
Tradicional	6	6	12																																																	
Todo	15	9	24																																																	
Respuesta	Kappa	Error estándar de Kappa	Z	P(vs > 0)																																																
negativo	0,563636	0,0870388	6,47569	0,0000																																																
positivo	0,563636	0,0870388	6,47569	0,0000																																																
	negativo	Todo																																																		
Molecular	6	6																																																		
Tradicional	6	6																																																		
Todo	12	12																																																		

Fuente: Minitab, 2019.

Para puré de banano congelado los resultados obtenidos del MDS 3M™ muestra que no hay ningún pico medido en unidades relativas de luz (RLU), por lo que todas las muestras son negativas. Para muestras inoculadas en 25 g, los resultados obtenidos fueron negativas (figura 15).

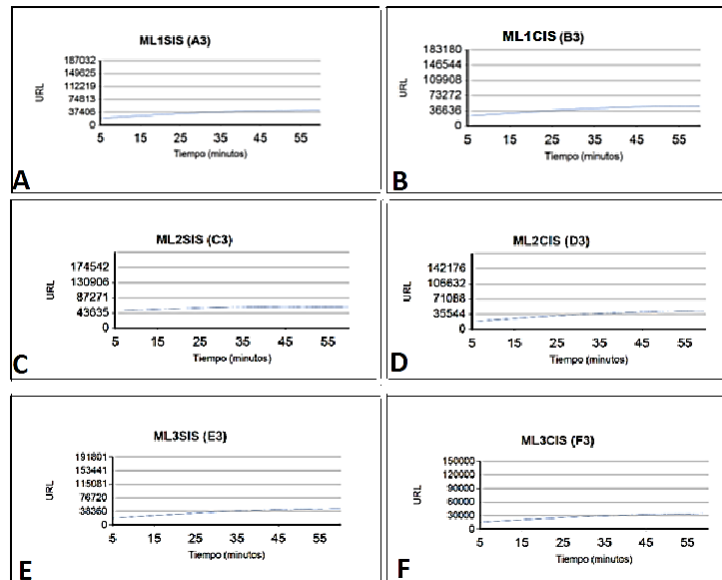
**Figura 15. Resultados obtenidos para puré de banano *Salmonella* sp.**



(A. Lote 1 sin inóculo; B. Lote 1 con inóculo; C. Lote 2 sin inóculo; D. Lote 2 con inóculo; E. Lote 3 sin inóculo; F. Lote 3 con inóculo).

Para puré de banano congelado en muestras inoculadas en 25 g con tres semanas de congelación, los resultados obtenidos del MDS 3M™ muestra que no hay ningún pico medido en unidades relativas de luz (RLU), por lo que todas las muestras son negativas (figura 16).

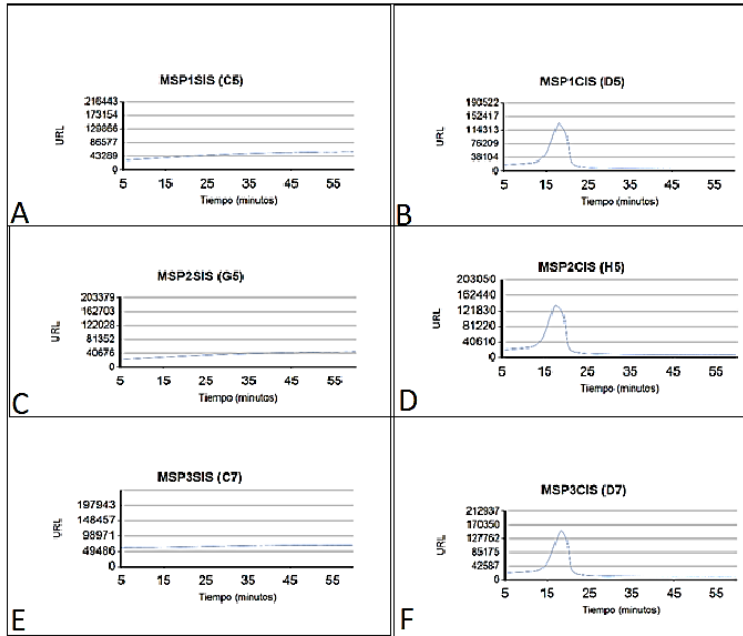
**Figura 16. Resultados obtenidos para puré de banano con tres semanas de congelación.**



(A. Lote 1 sin inóculo; B. Lote 1 con inóculo; C. Lote 2 sin inóculo; D. Lote 2 con inóculo; E. Lote 3 sin inóculo; F. Lote 3 con inóculo).

Para las muestras de superficies se observan picos (RLU) detectados para las muestras inoculadas, esto muestra que si hubo una amplificación de ADN por lo tanto las muestras que presentan estos picos son positivas (figura 17).

**Figura 17. Resultados obtenidos para superficies *Salmonella sp.***



(A. Cachera de llenado sin inóculo; B. Cachera de llenado con inóculo; C. drenaje sin inóculo; D. Drenaje con inóculo; E. Tubería sin inóculo; F. tubería con inóculo).

#### 4. Resultados de detección molecular en puntos de muestreo de superficies

Todos los puntos muestreados en la línea de puré de banano congelado dieron negativos para *Listeria sp* y *Salmonella sp*, los resultados se pueden observar en el anexo 5.

## Discusión de Resultados

La detección de patógenos en alimentos es de suma importancia para evitar enfermedades, para *Salmonella sp* y *Listeria monocytogenes* existen métodos de detección rápida como lo es el MDS 3M™, este método presenta una ventaja sobre los métodos tradicionales por su detección en un menor tiempo; es por ese ahorro en tiempo y recursos que estos métodos son cada vez más utilizados.

Por otro lado, las industrias buscan obtener un producto inocuo, en el caso de la empresa Paradise Ingredients su política integrada de gestión busca garantizar la inocuidad de sus productos, uno de ellos, el puré de banano congelado.

No solo se debe de monitorear el producto final, se debe de garantizar que la limpieza realizada en las diferentes áreas es correcta y que las medidas aplicadas evitan la contaminación cruzada que pueda afectar el producto y más aún la salud de los consumidores.

Métodos alternativos como el Sistema de detección Molecular (MDS) 3M™, utiliza la amplificación isotérmica de ADN (LAMP) y la detección de bioluminiscencia con alta especificidad y sensibilidad, además de ser un método de rápida ejecución (Yáñez, 2015).

Sin embargo, para garantizar que el método es adecuado para la matriz utilizada es necesario realizar una validación secundaria o verificación que permita conocer si el desempeño de un método es logrado con las condiciones del laboratorio (Camaró Sala, y otros, 2015).

Al establecer el diseño experimental se realizó un diseño factorial tipo 2 a la 3. Este tipo de diseño permite observar la acción de dos o más factores, en este caso se elaboraron 24 ensayos, con 3 bloques (lotes de puré de banano, punto de muestreo de superficies).

La ventaja de utilizar este diseño es principalmente que requieren pocos experimentos por cada factor estudiado y proporcionan una forma económica, además, los niveles pueden ser cualitativos o cuantitativos y las interpretaciones se puede realizar mediante el sentido común. Estos diseños se pueden ampliar, son de gran importancia práctica y proporcionan pistas para posteriores investigaciones (Box *et al*, 2008).

Como se observa en la figura 10, para *Listeria sp* se obtuvo que no existen diferencias entre los métodos analizados (Keith, 2003). Además, el análisis de índice de concordancia Kappa igual a 1 mostró que el existe concordancia perfecta entre los métodos (Días, 2011). Los análisis de sensibilidad, especificidad y exactitud relativa nos mostraron valores de 100%.

Se utiliza una prueba exacta de Fisher debido a que la muestra a estudiar es demasiado pequeña y no se cumplen las condiciones necesarias para que la aplicación del test chi cuadrado. El análisis de concordancia Kappa permite realizar un análisis en variables cualitativas (Días, 2011).

En las figuras 11, 12 y 13 para análisis de *Listeria sp* se observan picos que varían hasta los 281504 RLU (unidades relativas de luz), en tiempos desde los 15 a 35 minutos. Para determinar si las matrices interfieren con el resultado se han realizado otros experimentos utilizando el Sistema de Detección Molecular 3M™ donde obtuvieron para *Listeria sp* picos de luz desde los 15 a los 25 minutos, con RLU hasta los 299519 considerándose la altura de los picos independiente de la cantidad de bacterias presentes (Forsythe, 2013).

Podemos ver que el tiempo de detección de positivos es similar, el corto tiempo de detección muestra una alta eficiencia de amplificación del método, ya que, el ADN se amplifica en 15 a 75 minutos (rapidmicrobiology, 2019).

En otras validaciones, los autores han detectado con éxito especies de *Listeria sp* en productos congelados como helado (Arias *et al*, 2018). Bird *et al*, 2015 evaluaron el Sistema de Detección Molecular 3M™ en diferentes matrices, incluyendo superficies de acero inoxidable, para esta evaluación no obtuvieron diferencias signifivas comparándolo con método tradicional concordando con los resultados obtenidos en este proyecto (Bird *et al*, 2015).

Forsyte, 2013 mostró que conforme la concentración del inóculo es menor las curvas son más anchas y más bajas, en los resultados obtenidos se observaron este tipo de curvas en los análisis realizados tres semanas después de congelada las muestras y disminuye la sensibilidad del método molecular para la detección de positivos (figura 10). Se resalta la importancia del monitoreo de esta bacteria en matrices congeladas, ya que, sobrevive en los alimentos en periodos largos (Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS Sobre las Normas Alimentarias, 2007).

Se realizó un análisis con muestras congeladas tres semanas después para observar la resistencia de los microorganismos antes factores como la congelación, además, las guías de validación para productos congelados recomiendan que estas permanezcan durante un mínimo de 2 semanas a -20 ° C para ser analizadas. Para frutas y verduras congeladas se recomienda analizar *Listeria monocytogenes* y *Salmonella sp* (FDA, 2015). Para análisis de muestras con tres semanas de congelación se obtuvo un valor de kappa con concordancia buena para *Listeria sp*.

El análisis realizado en diferentes puntos de la línea de banano congelado nos permitió detectar sitios que pueden presentar un riesgo para contaminación con *Listeria sp*, dentro de los puntos analizados los resultados fueron negativos, sin embargo, el plan de monitoreo para patógenos debe incluir superficies que estén en contacto con el producto después de calentamiento. Los alimentos



pueden contaminarse por una materia prima contaminada agregada después del proceso térmico o por la recontaminación mediante el entorno (Almond Board of California, 2010).

Los drenajes analizados en la línea de banano congelado dieron negativos para la presencia de este patógeno, anteriormente en un estudio realizado por la universidad de Stellenbosch con una industria Sudafricana iniciado en el 2016, se explica la supervivencia y proliferación de biofilms de *L. monocytogenes* en el ambiente en plantas de proceso (Ackermann, 2018).

Ackermann, 2018 menciona que *Listeria sp* forma biofilm, estos se pueden madurar cuando no hay limpieza mecánica o tratamiento químico, en este estado son más resistentes que en estado de células libres (estado planctónico). También observaron la recuperación de *Listeria sp* después de múltiples tratamientos y se observó un aumento de la resistencia dentro de las horas.

Por lo tanto tener un monitoreo de superficies que se realice con una frecuencia establecida reduce el riesgo de re-contaminación después de la producción, tanto en la manipulación y almacenamiento (Ackermann, 2018).

En el caso de *Salmonella sp* podemos observar diferencias entre ambos métodos, esto debido a que el método MDS 3M™ no detectó *Salmonella* en las muestras de puré de banano, pero si fue detectado por método tradicional. Se afectaron valores de sensibilidad, especificidad y exactitud relativa como se muestra en el cuadro 5 y una concordancia Kappa moderada (Días, 2011). Las muestras analizadas tres semanas después de congelada mostraron resultados negativos para ambos métodos por lo tanto no se puede calcular el índice kappa ni la prueba exacta de Fisher.

La concentración del inóculo utilizado es muy baja para que sobreviva a largos periodos de congelación. Este microorganismo puede ser afectado a temperaturas de 0 °C y -10 °C pero no garantiza su destrucción total en los alimentos (Robledo, 2015).

Para las muestras de puré de banano congelado no se obtuvieron picos (figuras 15 y 16), esto significa que la luciferasa no generó luz, ya que, al no haber una amplificación de ADN no se genera ATP, por lo tanto las muestras son negativas en la detección del microorganismo blanco (Yáñez, 2015).

Forsythe, 2013 obtuvo resultados satisfactorios en la detección de diferentes serotipos de *Salmonella sp*, utilizando el Sistema de Detección Molecular 3M™, sin embargo, en este estudio se utilizaron matrices diferentes y temperaturas de inoculación acorde con la matriz analizada.

La temperatura de crecimiento para *Salmonella sp* esta entre los 7 °C a 48 °C, a pesar de esto en Canadá y Estados Unidos se han dado reportes de brotes con diferentes serotipos de *Salmonella* en nuggets de pollo congelado, atún congelado y repostería congelada (PR Newswire, 2019 & Canada Newswire, 2019).

En el 2010 se asociaron brotes de *Salmonella sp* a comida congelada, en un estudio de casos y controles de varios estados en Estados Unidos, donde la falta de cocción en alimentos congelados que no son listos para consumir aumentaba el riesgo de enfermarse, además, es importante considerar el riesgo con uso de alimentos contaminados como materias primas (Rounds *et al*, 2013).

En un ensayo realizado para la validación de un método alternativo para la detección de *Salmonella sp* utilizaron muestras de helado, inoculado artificialmente y posteriormente congelado, obteniendo resultados positivos para las muestras inoculadas, mostrando que no existía diferencias entre los métodos utilizados (Feldsine *et al*, 2010).

Por lo tanto es probable que la temperatura de refrigeración en que se mantuvo la muestra antes de ser contaminada artificialmente no fuera el factor que afectó la detección de positivos en el puré, además, pruebas del MDS 3M™ en la matriz en banano anteriormente realizadas dieron resultados validos (anexo 6). Se deben realizar pruebas más robustas en esta matriz para observar si existen efectos de la temperatura de la muestra sobre la detección de *Salmonella sp*.

Factores importantes en la implementación del Sistema de Detección Molecular 3M™ son el tiempo y la temperatura de inoculación en el preenriquecimiento. Validaciones realizadas en trabajos anteriores no demostraron diferencias significativas entre diferentes métodos comparados en seis matrices alimentarias con tiempos de incubación de 20–22 h (Higgins *et al*, 2019). Feldsine *et al*, 2010 utilizaron temperaturas de incubación de 35°C a 37 °C con resultados satisfactorios.

Otro informe de validaciones realizadas con el metodo MDS 3M™, muestra que los laboratorios obtuvieron lecturas en muestras no inoculadas y detectaron problemas en la detección por una incorrecta ejecución en el proceso de lisis y contaminación, por esto es necesario llevar a cabo cada paso en el correcto tiempo y la temperatura adecuada (Bird *et al*, 2016). Es importante tener en cuenta que una baja Aw puede ser perjudicial para la supervivencia de la *Salmonella* a 55° C a 60° C (Almond Board of California, 2010).

Debido a que la temperatura de incubación variaba y no se mantuvo homogénea durante el preenriquecimiento en este ensayo, pudo afectar la recuperación del microorganismo, además, se debe considerar que la temperatura de incubación a 41,5 °C podría no ser la adecuada, por lo que se deben evaluar temperaturas de incubación a 37 °C como lo indica el procedimiento para otro tipo de matrices.

En el análisis de superficies para *Salmonella sp*, es importante considerar el factor temperatura ya que, una contaminación cruzada podría ocasionar problemas de brotes de este microorganismo. En las muestras analizadas para *Salmonella sp* el 100% dieron negativas, sin embargo, se debe mantener la constante vigilancia y mejoramiento del plan de monitoreo de patógenos.

En análisis de superficies Webber *et al*, 2019, detectaron formación de biofilms de *Salmonella* en temperaturas de 3 °C y 9 °C, mencionan que trabajos anteriores mostraron la formación de biofilms de *Salmonella Enteritidis* a 4 °C, mostrando, además, su resistencia al tratamiento con cloro. Los autores hacen mención a otros trabajos donde se determinó como mínima una temperatura de 5 ° C para el crecimiento de *Salmonella sp*.

A una temperatura de 70 °C es más difícil inactivar el patógeno en el ambiente (Almond Board of California, 2010). Otros autores mencionan que la formación de biofilm por diferentes cepas de *Salmonella sp* es mayor a temperaturas 22 °C (Soni *et al*, 2013).

Las plagas como los roedores, aves, cucarachas y moscas pueden albergar y transmitir presencia de la *Salmonella sp.* en el ambiente (Almond Board of California, 2010).

Con los resultados obtenidos podemos decir que para *Listeria sp* no hay diferencias significativas entre los métodos, sin embargo, en el caso de *Salmonella sp* se deben de hacer más pruebas para la matriz de banano congelado. En el caso de muestreo de superficies se debe de seguir con los monitoreos en las frecuencias establecidas y con las prácticas adecuadas de limpieza para evitar la formación de biofilms de los microorganismos analizados.

## Conclusiones y Recomendaciones

La similitud entre los resultados obtenidos para la detección de *Listeria sp* utilizando el método tradicional y por el método MDS 3M™ es la prueba de que si se pueden obtener resultados confiables por el método alternativo para las matrices de puré de banano congelado y superficies.

La sensibilidad calculada fue de 100% para la detección de *Listeria sp*, es decir que el método MDS 3M™ tiene una alta capacidad de detectar muestras positivas.

La similitud entre los resultados obtenidos para la detección de *Salmonella sp* para las superficies utilizando el método tradicional y por el método MDS 3M™ es la prueba de que si se pueden obtener resultados confiables por el método MDS 3M™ .

La diferencia entre los resultados obtenidos para la detección de *Salmonella sp* utilizando el método tradicional y por el método MDS 3M™ muestra que bajo las condiciones empleadas el método MDS 3M™ no detecta verdaderos positivos para la matriz de puré de banano congelado.

Se recomienda realizar más pruebas para la matriz de banano congelado en la detección de *Salmonella sp*, controlando temperatura de incubación y utilizando diferentes concentraciones de inóculo.

Se recomienda realizar más repeticiones para las matriz de puré de banano congelado para analizar si es necesario la detección de este microorganismo en esta matriz

Se recomienda realizar más repeticiones de los puntos de monitoreo de superficies para detección de *Salmonella sp* y *Listeria sp*, además, incluir puntos como antecámaras y tanque frío para análisis de *Salmonella sp*.

## Bibliografía

1. Aguilar, J. 2015. Incidencia de *Salmonella* en alimentos de baja actividad de agua. Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro. Grado de maestría . <http://ring.uaq.mx/bitstream/123456789/780/1/RI003337.pdf>
2. Almond Board of California. 2010. Monitoreo ambiental de patógenos guía a seguir. Available at: [https://www.almonds.com/sites/default/files/pem\\_go\\_to\\_guide\\_spanish\\_final.pdf](https://www.almonds.com/sites/default/files/pem_go_to_guide_spanish_final.pdf)
3. Almond Board of California. 2010. programa de monitoreo ambiental de patógenos. Available at: [https://www.almonds.com/sites/default/files/spanish\\_pem\\_book\\_final.pdf](https://www.almonds.com/sites/default/files/spanish_pem_book_final.pdf)
4. Alvarenga, R & Rodríguez de Álvarez, K. P. 2018. *Determinación De La Contaminación De Listeria Monocytogenes, Escherichia Coli y Salmonella Sp. en Carne De Cerdo Y Bovino En La Sala De Matanza De Santa Ana*. Tesis MSc. San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador.122p.
5. Akermann, E. 2018. Biofilms: A Lifestyle Choice for Listeria Monocytogenes. South African Food Science & Technology magazine. Volume 73, No. 2. Disponible en: <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2019/february/features/how-listeria-biofilms-respon-to-different-sanitizers>
6. AOAC INTERNATIONAL (OMA method number 2016.01
7. AOAC Official Method of Analysis<sup>SM</sup> (OMA) 993.12}
8. Arias-Rios Veronica, E; Tenney, K; Tam Mai, Anderson, S; Marie Cantera, R; Nadala, L; M Samadpour. 2018. Rapid Detection of Listeria in Ice Cream in 13 Hours Using the Roka Listeria Detection Assay. *Journal of AOAC International*, 101(6), 1806–1812.
9. Arroyo , M; Morales, G; Sosa , P & Carmona-Fonseca, J. 2008. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de Plasmodium: nueva técnica diagnóstica. *Revista de los estudiantes de la universidad industrial de santander* 21:158-75.
10. Bird, *et al.* 2013. Evaluation of 3M molecular detection assay (MDA) *Salmonella* for the detection of *Salmonella* in selected foods: collaborative study. *J AOAC Int.* 96(6):1325-35.
11. Bird, *et al.* 2015. Evaluation of 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) Listeria for the Detection of Listeria species in Selected Foods and Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2014.06. *Journal of AOAC International* Vol. 98 (4): 993-1002.
12. Bird, P; Flannery, J; Crowley, E; Agin, J & Goins, D. 2016. Evaluation of the 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2 – *Salmonella* for the Detection of *Salmonella* spp. in Select Foods and Environmental Surfaces: Collaborative Study. *Journal of AOAC international* 99(4):980-997.
13. Bird, P; Flannery, J; Crowley, E; Agin, J; Goins, D; Monteroso, L; Benesh, D. 2015. Evaluation of 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) Listeria for the Detection of Listeria species in Selected Foods and Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2014.06. *Journal of AOAC International*, 98(4), 993–1002.
14. Bird, P; Flannery, J; Crowley, E; Agin, J & Goins, D. 2017. Evaluation of the 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2 – Listeria monocytogenes for the Detection of Listeria monocytogenes in a Variety of Foods and Select Environmental Surfaces: Collaborative Study. *Journal of AOAC international* 100(2):454-469
15. Bird, P; Flannery, J; Crowley, E; Agin, J. R; Goins, D; Monteroso, L; 2016. Evaluation of the 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2 - Salmonella for the Detection of Salmonella spp.

- in Select Foods and Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2016.01. *Journal of AOAC International*, 99(4), 980–997.
16. Box, G., Stuart, J., & Hunter, W. 2008. *Estadística para investigadores: diseño, innovación y descubrimiento*. Barcelona, España: Reverté
  17. Camaró Sala, M; Martínez García, R; Olmos Martínez, P; Catalá Cuenca, V; Ocete Monchón, M & Gimeno Cardona, C. 2015. Validación y verificación analítica de métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 33(7): 31-36
  18. Canada Newswire. 2019, May 2. UPDATE: Public Health Notice - Outbreak of Salmonella infections linked to Celebrate brand frozen classic/classical and egg nog flavoured profiteroles (cream puffs) and mini chocolate eclairs. Canada Newswire. [citado 12 octubre 2019]. Disponible en: <http://search.ebscohost.com.ezproxy.itcr.ac.cr/login.aspx?direct=true&db=bwh&AN=201905021638CANADANWCANADAPR.C3410&lang=es&site=ehost-live>
  19. Chicas Romero, M. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, mayo 2019.
  20. Cloke, J; Arizanova, J; Crabtree, D; Evan, k & SimpSon, H. 2016. Validation of the Applied Biosystems 7500 Fast Instrument for Detection of Listeria Species with the SureTect Listeria Species PCR Assay. *Journal of AOAC International* 99(2):407-416
  21. Codex Alimentarius. 1999. *Programa Conjunto FAO/OMS Sobre las Normas Alimentarias Comité del Codex Sobre la Higiene de los Alimentos*. Washington, D.C., EE. UU. 29 nov. 17p.
  22. Codex Alimentarius. 2007. *Programa Conjunto FAO/OMS Sobre las Normas Alimentarias Comité del Codex Sobre la Higiene de los Alimentos*. Roma, Italia. 7 jul. 17p.
  23. Decreto 41.420-COMEX-S-MAG-MEIC, 2018. Publica Resolución N° 402-2018 (COMIECO-LXXXIII) de fecha 28/06/2018 y su Anexo:"Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:17 Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de los Alimentos". Sistema Costarricense de Información Jurídica. San José, Costa Rica. 16/07/2018.
  24. Díaz Portillo Jacobo. 2011. *Guía Práctica del Curso de Bioestadística Aplicada a las Ciencias de la Salud*. Instituto Nacional de Gestión Sanitaria. Colección Editorial de Publicaciones del INGESA. 1355p. [citado 11 octubre 2019]. Disponible en: [http://www.ingesa.mscbs.gob.es/estadEstudios/documPublica/internet/pdf/Guia\\_Practica\\_Bioestadistica.pdf](http://www.ingesa.mscbs.gob.es/estadEstudios/documPublica/internet/pdf/Guia_Practica_Bioestadistica.pdf)
  25. Fallas, Cristina. 2016. Grupo inversionista adquiere fábrica de Gerber Ingredients en Cartago. *El Financiero*. San José, Costa Rica. 26 feb.
  26. FDA (Food & Drug Administration Office of Foods and Veterinary Medicine) [en línea]. 2015. [citado 11 octubre 2019]. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds. 2 ed. Disponible en: [fda.gov/media/83812/download](http://fda.gov/media/83812/download)
  27. Feldsine, P. T; Lienau, A. H; Kerr, D. E; Jucker, M. T; Kaur, M. 2010. Evaluation of the Assurance GDS for Salmonella Method in Foods and Environmental Surfaces: Multilaboratory Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 93(1), 150–162.
  28. Food Safety and Inspection Service. USDA. 2015, *El Congelar y la Inocuidad de los Alimentos*. <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/informational/en-espanol/hojasinformativas/manejo-adecuado-de-alimentos/el-congelar/el-congelar>
  29. Food Safety and Inspection Service. USDA. 2017, *Salmonella Compliance Guidelines for Small and Very Small Meat and Poultry Establishments that Produce Ready-to-Eat (RTE) Products and Revised Appendix A*. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/bf3f01a1-a0b7-4902-a2df-a87c73d1b633/Salmonella-Compliance-Guideline-SVSP-RTE-Appendix-A.pdf?MOD=AJPERES>

30. Fortes E; David J; Koeritzer B; Wiedmann M. 2013. Validation of the 3M Molecular Detection System for the Detection of Listeria in Meat, Seafood, Dairy, and Retail Environments. *Journal of Food Protection* 76(5): 874–878.
31. Forsythe, S. 2013. Use of the 3M™ Molecular Detection System for Salmonella and Listeria spp. Pathogen Research Centre, School of Science and Technology. [citado 11 octubre 2019]. Disponible en: <https://multimedia.3m.com/mws/media/9139020/3m-mds-for-salmonella-listeria-prof-steve-forsythe-uk-case-study.pdf>
32. Garrido. P. 2016. Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP. Ventajas en el Diagnóstico Sanitario. *Revista Científica Ecuatoriana*, 2016, Vol. 3. P 11-14
33. Hernández-Porras, E; Rosero-Torre, L; Parra-Barrera, E; Guerrero-Montilla, J; Gómez-Rubio, A & Moreno, J. 2017. Brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos estudiados mediante técnicas moleculares. *Rev. Salud Pública*, 19 (5): 671-678
34. Higgins, D; Urquhart, H; Kelly, S; Illingworth, S; Perera, N; Bastin, B; Goins, D. 2019. Validation of Solus One Salmonella from Select Food Matrixes and Stainless-Steel and Plastic Environmental Surfaces. *Journal of AOAC International*, 102(4), 1145–1161.
35. Huertas Caro, C., Urbano Cáceres, E., & Torres Caycedo, M. (2019). Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 513-528
36. Jimenez, J. 2017. (24.05)Listeria monocytogenes: la rara pero agresiva bacteria oculta en alimentos mal manipulados. NOTICIAS UCR. <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2017/05/24/listeria-monocytogenes-la-rara-pero-agresiva-bacteria-oculta-en-alimentos-mal-manipulados.html>
37. Keith M. Bower. 2003. When To Use Fisher’s Exact Test (en línea). Citado (14 de octubre 2019). Disponible en: [http://minitab17.com/uploadedFiles/Content/News/Published\\_Articles/fisher\\_exact\\_test.pdf](http://minitab17.com/uploadedFiles/Content/News/Published_Articles/fisher_exact_test.pdf)
38. Lazos Martínez R, & Hernández Gutiérrez, I. 2004. Centro Nacional de Metrología. (Simposio). La Validación de Métodos: Un enfoque práctico (Simposio de Metrología 2004, El Marqués, México). Querétaro, México. 5 p.
39. Martínez Hartung Catalina Paz. 2016. Implementación y verificación de un método cualitativo y uno cuantitativo para el análisis de Listeria monocytogenes en productos hidrobiológicos. Tesis pregrado. Santiago, Chile. Universidad de Chile. 43 p.
40. Master Plan Zoning Paradise Ingredients. Rev 8. 2019
41. Ministerio de Salud. 2011. Política Nacional para la Seguridad Alimentaria y Nutricional 2011-2021. - 1ª ed. - San José, Costa Rica. Disponible en Internet: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos/sobre-el-ministerio/politcas-y-planos-en-salud/politcas-en-salud/1106-politica-nacional-de-seguridad-alimentaria-y-nutricional-2011-2021/file>
42. Ministerio de salud. Boletín Estadístico de Enfermedades de Declaración Obligatoria en Costa Rica del año 2015. <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/estadisticas-y-bases-de-datos/notificacion-individual/3167-boletin-de-morbilidad-enfermedades-de-declaracion-obligatoria-2015-2/file>
43. Moreira Diego, 2016. Procedimiento para el programa de monitoreo de Listeria monocytogenes en medioambiente en establecimientos habilitados para los estados unidos. Direccion general de servicios ganaderos division industria animal. <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/uru153522anx.pdf>

44. OAA (Organismo Argentino de Acreditación). 2013. Guía para la Validación de Métodos Microbiológicos. Versión 1:1-17. [citado 11 octubre 2019]. Disponible en: [oaa.org.ar/docs/GUI-LE-05%20v1.pdf](http://oaa.org.ar/docs/GUI-LE-05%20v1.pdf)
45. OMS. 2017. Inocuidad de los alimentos. <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/food-safety>
46. Organización Mundial de la Salud. Febrero. 2018. Listeriosis. <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/listeriosis/es/>
47. Paradise Ingredients. 2019. HACCP/CCP Línea de puré de Banano Congelado. Departamento Calidad.
48. Paradise Ingredients. 2019. Tabla de Especificaciones Físico -Químicas Puré de Banano Congelado. Departamento Comercial e Innovación.
49. Paradise-ingredients [en línea]. Certifications. [citado 15 de marzo 2019]. Disponible en Internet: <http://www.paradiseingredients.com/certifications>
50. Peña-Castro, Julián M; Gregorio-Ramírez, Oscar & Barrera-Figueroa, Blanca E. 2013. Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación química*, 24(2), 237-246. [citado 03 de noviembre 2019]. Disponible en [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-893X2013000200009&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2013000200009&lng=es&tlng=es)
51. PR Newswire. 2019. FDA Fast Facts: FDA and partners investigate Salmonella Newport outbreak linked to frozen ground tuna, retailers should discard recalled product. PR Newswire US. [citado 11 octubre 2019]. Disponible en: <http://search.ebscohost.com.ezproxy.itcr.ac.cr/login.aspx?direct=true&db=bwh&AN=201904162159PR.NEWS.USPR.DC21962&lang=es&site=ehost-live>
52. Qianru Yang; Domesle, K & Fei Wang. 2016. Rapid detection of *Salmonella* in food and feed by coupling loop-mediated isothermal amplification with bioluminescent assay in real-time . *BMC Microbiology* 16:112
53. Qvist, S. (2011). International Validation, Ring Trial, and Standardization of Rapid Methods. En I. H. J, Rapid Detection, Characterization, and Enumeration of Foodborne Pathogens (págs. 157-161). Washington, DC: ASM Press
54. Rapidmicrobiology. 2019. (en línea, sitio web). Molecular Testing of Food Pathogens. Consultado 14 ene.2019. Disponible en <https://www.rapidmicrobiology.com/test-method/molecular-testing-for-food-pathogens>
55. Robledo, A.2015. Investigación de Salmonella spp en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos. Tesis grado. Universitat Politècnica de Catalunya. Consultado 25 octubre de 2019. Disponible en <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/26111/memoria.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
56. Rounds, J., Schlegel, J., Lane, T., Higa, J., Kissler, B., Culpepper, W., ... Hausman, L. 2013. Multistate Outbreak of Salmonella Chester Infections Associated with Frozen Meals -- 18 States, 2010. *MMWR: Morbidity & Mortality Weekly Report*, 62(48), 979–982. [citado 12 octubre 2019]. Disponible en: <http://search.ebscohost.com.ezproxy.itcr.ac.cr/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=92746388&lang=es&site=ehost-live>
57. Soni, K. A; Oladunjoye, A; Nannapaneni, R; Schilling, M. W; Silva, J. L; Mikel, B; Bailey, R. H. 2013. Inhibition and Inactivation of Salmonella Typhimurium Biofilms from Polystyrene and Stainless Steel Surfaces by Essential Oils and Phenolic Constituent Carvacrol. *Journal of Food Protection*, 76(2), 205–212.



58. Teijón, Rivera, J, & Gaitán, M. 2017. Fundamentos de bioquímica estructural. 3a. ed. Editorial Tébar Flores. Consultado 3 de noviembre 2019. Disponible en <https://ebookcentral.proquest.com/lib/itcrsp/detail.action?docID=5513802>.
59. Velazquez, F. 2003. Detección de *Listeria Monocytogenes* y *Listeria sp* en puntos críticos establecidos en una planta procesadora de Productos congelados de rápido consumo. Tesis MSc. San Nicolás de los Garza, México, Universidad Autónoma De Nuevo León. 60p.
60. Webber, B; De Oliveira, A. P; Pottker, E. S; Daroit, L; Levandowski, R; Dos Santos, L. R; Rodrigues, L. B. 2019. *Salmonella* Enteritidis forms biofilm under low temperatures on different food industry surfaces. *Ciência Rural*, 49(7), 1–9.
61. Yáñez, V. (15 de Enero de 2015). Uso y ventajas de amplificación isotérmica en la detección de microorganismos patógenos en la detección de alimentos y control ambiental (en línea, sitio web). Consultado 13 ene 2019. Disponible en <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/08/1-3M-Uso-y-ventajas-de-amplificacion-isot--rmica-en-la-deteccion-microorganismos-004.pdf>
62. Yehia, H., Ibraheim, S., & Hassanein, W. (2016). Prevalence of *Listeria* species in some foods and their rapid identification . *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 15(5):1047-1052

## Anexos

### Anexo 1. Resultados análisis externos para puré de banano congelado *Listeria sp* (Izquierda muestras inoculadas; derecha muestras sin inocular).

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Puré de banano congelado, Lote L1CIL		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	30/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Hazel Ureña
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de <i>Listeria</i> spp.*	Presente**	Presencia/Ausencia 25g	BAM C10
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			
Opiniones e interpretaciones **Se aísla <i>Listeria innocua</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Puré de banano congelado, Lote L1SIL		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	29/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Estefanie Jimenez
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de <i>Listeria</i> spp.*	Ausente	Presencia/Ausencia 25g	BAM C10
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Puré de banano congelado, Lote L2CIL		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	30/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Hazel Ureña
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de <i>Listeria</i> spp.*	Presente**	Presencia/Ausencia 25g	BAM C10
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			
Opiniones e interpretaciones **Se aísla <i>Listeria monocytogenes</i>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Puré de banano congelado, Lote L2SIL		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	29/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Estefanie Jimenez
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de <i>Listeria</i> spp.*	Ausente	Presencia/Ausencia 25g	BAM C10
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Puré de banano congelado, Lote L3CIL		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	30/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Hazel Ureña
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de <i>Listeria</i> spp.*	Presente**	Presencia/Ausencia 25g	BAM C10
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			
Opiniones e interpretaciones **Se aísla <i>Listeria monocytogenes</i>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Puré de banano congelado, Lote L3SIL		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	29/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Estefanie Jimenez
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de <i>Listeria</i> spp.*	Ausente	Presencia/Ausencia 25g	BAM C10
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

## Anexo 2. Resultados analisis externos para puré de banano congelado *S. enterica* sv *Typhimurium* (Izquierda muestras inoculadas; derecha muestras sin inocular).

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b> Puré de banano congelado, Lote L1C1S			
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	30/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Hazel Ureña
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de Salmonella spp.*	Presente	Presencia/Ausencia 25g	BAM C5
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b> Puré de banano congelado, Lote L2C1S			
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	30/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Hazel Ureña
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de Salmonella spp.*	Presente	Presencia/Ausencia 25g	BAM C5
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b> Puré de banano congelado, Lote L3C1S			
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	30/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Hazel Ureña
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de Salmonella spp.*	Presente	Presencia/Ausencia 25g	BAM C5
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b> Puré de banano congelado, Lote L1S1S			
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	29/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Estefanie Jimenez
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de Salmonella spp.*	Ausente	Presencia/Ausencia 25g	BAM C5
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b> Puré de banano congelado, Lote L2S1S			
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	29/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Estefanie Jimenez
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de Salmonella spp.*	Ausente	Presencia/Ausencia 25g	BAM C5
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b> Puré de banano congelado, Lote L3S1S			
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	29/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Estefanie Jimenez
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de Salmonella spp.*	Ausente	Presencia/Ausencia 25g	BAM C5
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

**Anexo 3. Resultados analisis externos para superficies *Listeria sp* (Izquierda muestras inoculadas; derecha muestras sin inocular).**

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Superficie de acero inoxidable, Lote SP1CIL		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	30/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Hazel Ureña
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de <i>Listeria spp.</i> *	Presente**	Presencia/Ausencia	BAM C10
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a> Opiniones e interpretaciones ** Se aisló <i>Listeria monocytogenes</i>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Superficie de acero inoxidable, Lote SP13IL		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	29/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Estefanía Jiménez
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de <i>Listeria spp.</i> *	Ausente	Presencia/Ausencia	BAM C10
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Superficie de acero inoxidable, Lote SP2CIL		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	30/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Hazel Ureña
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de <i>Listeria spp.</i> *	Presente**	Presencia/Ausencia	BAM C10
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a> Opiniones e interpretaciones ** Se aisló <i>Listeria monocytogenes</i>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Superficie de acero inoxidable, Lote SP25IL		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	29/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Estefanía Jiménez
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de <i>Listeria spp.</i> *	Ausente	Presencia/Ausencia	BAM C10
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Superficie de acero inoxidable, Lote SP3CIL		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	30/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Hazel Ureña
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de <i>Listeria spp.</i> *	Presente**	Presencia/Ausencia	BAM C10
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Superficie de acero inoxidable, Lote SP35IL		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	29/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Estefanía Jiménez
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de <i>Listeria spp.</i> *	Ausente	Presencia/Ausencia	BAM C10
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

## Anexo 4. Resultados analisis externos para superficies *Salmonella sp* (Izquierda muestras inoculadas; derecha muestras sin inocular).

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Superficie de acero inoxidable, Lote SP1C1S		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	30/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Hazel Ureña
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de Salmonella spp.*	Presente	Presencia/Ausencia	BAM CS
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Superficie de acero inoxidable, Lote SP2C1S		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	30/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Hazel Ureña
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de Salmonella spp.*	Presente	Presencia/Ausencia	BAM CS
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Superficie de acero inoxidable, Lote SP3C1S		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	30/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Hazel Ureña
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de Salmonella spp.*	Presente	Presencia/Ausencia	BAM CS
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Superficie de acero inoxidable, Lote SP1S1S		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	29/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Estefanía Jimenez
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de Salmonella spp.*	Ausente	Presencia/Ausencia	BAM CS
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Superficie de acero inoxidable, Lote SP2S1S		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	29/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Estefanía Jimenez
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de Salmonella spp.*	Ausente	Presencia/Ausencia	BAM CS
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

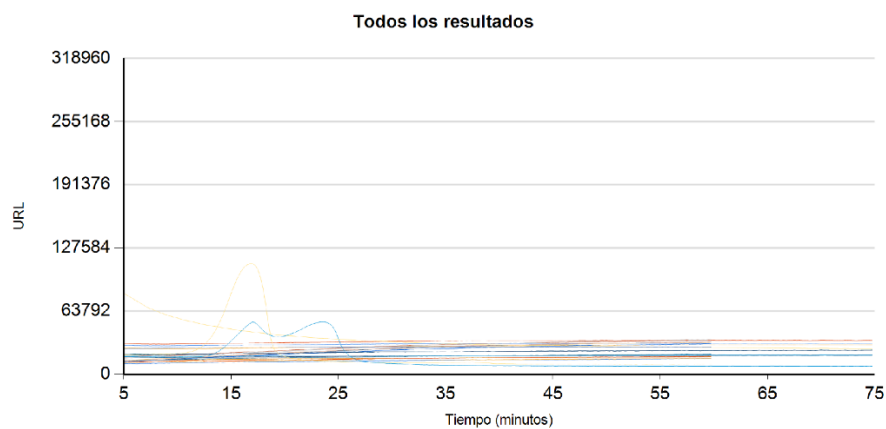
Atención Sebastián Brenes Coto Cía. Paradise Ingredients, S.A. Tel 2590-2843			
<b>Datos de la toma y recolección de la muestra</b>			
<b>Descripción:</b>	Superficie de acero inoxidable, Lote SP3S1S		
<b>Fecha y hora de toma:</b>	21/8/2019	<b>Fecha de entrada:</b>	21/8/2019
<b>Persona que recolecta:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Inicio de análisis:</b>	24/8/2019
<b>Lugar de recolección:</b>	Paradise Ingredients, S.A.	<b>Fin de análisis:</b>	29/8/2019
<b>Condiciones ambientales:</b>	25 °C	<b>Generado por:</b>	Estefanía Jimenez
<b>Microbiología Cualitativa</b>			
<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Método</b>
Presencia de Salmonella spp.*	Ausente	Presencia/Ausencia	BAM CS
* Análisis acreditado Ver alcance en <a href="http://www.eca.or.cr">www.eca.or.cr</a>			

## Anexo 5. Resultados análisis para monitoreo de superficies.

Software de Detección Molecular 3M						
Reporte de la corrida						
Id. de la corrida	muestras superficies		Fecha de la corrida	10/10/2019 12:11:05 p. m.		
Estado de la corrida	Completado		Usuario	Ingrid Mendez		
Técnico	Ingrid Mendez		Reportado por	Ingrid Mendez		
Comentario de la corrida			equipo	0216020128:216020128		

Id. de pozo	Id. de muestra	Tipo de ensayo	Tipo de pozo	Número de Lote de kit	Resultado	Comentario
A1	drenaje piso	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
B1	Drenaje pila	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
C1	Tanque Rodger	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
D1	Camara de congelación 5	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
E1	Camara de congelación 6	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
F1	Camara de congelación 7	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
G1	material de empaque	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
H1	Condensados antecamara	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	sobre producto descongelacion
A3	drenaje piso	Salmonella-2	Muestra	2896942	Negativo	
B3	Drenaje pila	Salmonella-2	Muestra	2896942	Negativo	
C3	Tanque Rodger	Salmonella-2	Muestra	2896942	Negativo	
D3	material de empaque	Salmonella-2	Muestra	2896942	Negativo	
A11		Salmonella-2	Control negativo	2896942	Válido	
B11		Listeria-2	Control negativo	2885766	Válido	
A12		Salmonella-2	Control de reactivos	2896942	Válido	
B12		Listeria-2	Control de reactivos	2885766	Válido	



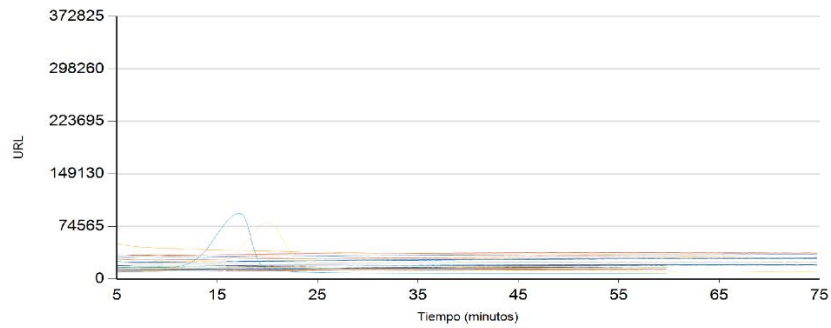
**Software de Detección Molecular 3M**

**Reporte de la corrida**

<b>Id. de la corrida</b>	validación congelado	<b>Fecha de la corrida</b>	11/10/2019 03:02:30 p. m.
<b>Estado de la corrida</b>	Completado	<b>Usuario</b>	Ingrid Mendez
<b>Técnico</b>	Ingrid Mendez	<b>Reportado por</b>	Ingrid Mendez
<b>Comentario de la corrida</b>		<b>equipo</b>	0216020128:216020128

Id. de pozo	Id. de muestra	Tipo de ensayo	Tipo de pozo	Número de Lote de kit	Resultado	Comentario
A1	Tanque de almacenamiento frio	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
B1	Filtro FMC 1	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
C1	Cachera de llenado izquierda	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
D1	Cachera de llenado derecha	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
E1	Termos de enfriamiento	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
F1	Filtro PPRO Derecho	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
G1	Filtro PPRO izquierdo	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
H1	Tanque nivel	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
A2	Filtro FMC 2	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
B2	Tanque de almacenamiento Flash	Listeria-2	Muestra	2885766	Negativo	
A5	Tanque de almacenamiento frio	Salmonella-2	Muestra	2931705	Negativo	
B5	Filtro FMC 1	Salmonella-2	Muestra	2931705	Negativo	
C5	Cachera de llenado izquierda	Salmonella-2	Muestra	2931705	Negativo	
D5	Cachera de llenado derecha	Salmonella-2	Muestra	2931705	Negativo	
E5	Filtro PPRO Derecho	Salmonella-2	Muestra	2931705	Negativo	
F5	Filtro PPRO izquierdo	Salmonella-2	Muestra	2931705	Negativo	
G5	Tanque nivel	Salmonella-2	Muestra	2931705	Negativo	
H5	Filtro FMC 2	Salmonella-2	Muestra	2931705	Negativo	
A6	Tanque de almacenamiento Flash	Salmonella-2	Muestra	2931705	Negativo	
A11		Listeria-2	Control negativo	2885766	Válido	
B11		Salmonella-2	Control negativo	2931705	Válido	
A12		Listeria-2	Control de reactivos	2885766	Válido	
B12		Salmonella-2	Control de reactivos	2931705	Válido	

**Todos los resultados**



**Anexo 6.** Resultados pruebas de interferencia de matrices (Paradise ingredients, 2018).

<b>MATRIX SAMPLE</b>	<b>Validation</b>			<b>Result</b>
	kit <i>Salmonella</i> <i>sp</i>	Kit <i>Listeria sp</i>	Kit Matrix	
Frozen banana purée without essence	Negative	Negative	Valid	Satisfactory
Frozen banana purée with essence	Negative	Negative	Valid	Satisfactory
Frozen banana purée with essence and Vitamin C	Negative	Negative	Valid	Satisfactory
Natural Aseptic banana purée	Negative	Negative	Valid	Satisfactory
Aseptic banana purée with Vitamin C	Negative	Negative	Valid	Satisfactory
Organic Natural Aseptic banana purée	Negative	Negative	Valid	Satisfactory
Organic Aseptic banana purée with Vitamin	Negative	Negative	Valid	Satisfactory
Aseptic banana purée with Vitamin C and citric acid	Negative	Negative	Valid	Satisfactory
Aseptic banana purée with seeds, Vitamin C and citric acid	Negative	Negative	Valid	Satisfactory
Organic Aseptic banana purée with Vitamin C and citric acid	Negative	Negative	Valid	Satisfactory
Unpasteurized banana purée	Negative	Negative	Valid	Satisfactory
Unpasteurized organic banana purée	Negative	Negative	Valid	Satisfactory
Banana essence	Negative	Negative	Valid	Satisfactory



