

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Validación del Método de Ensayo Rápido (MERs)  
para la Detección e Identificación de la especie  
*Salmonella enterica* en la matriz Harina de  
Pescado**

Vanezza Raquel Correa Habranhson

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en  
Biología

Lima, Perú

2018

## DEDICATORIAS

*A Octavio por ser mi compañero de toda la vida, el hombre que me convenció de lo que podía ser capaz, por enseñarme siempre el camino correcto que a veces no suele ser el justo pero es el correcto, por cuidarme en cada momento, por apoyarme y tener siempre las palabras correctas para cada situación. Estoy segura que he podido llegar a donde estoy por todo su apoyo.*

*A mi hija Nicolle por ser mi motor día a día, por entender las veces que no tenía mucho tiempo disponible, pero siempre hicimos del poco tiempo juntas los mejores momentos.*

*A mi madre por enseñarme siempre a hacer las cosas bien como corresponden, por enseñarme a ser perseverante, honesta y apasionada con todo lo que me propongo. Te admiro madre porque de lo poco siempre hiciste lo más extraordinario, de las situaciones difíciles siempre hiciste ejemplos de vida. Sé que estas líneas no son suficientes para demostrarte todo mi agradecimiento.*

*A mis hermanos; por siempre estar dispuestos a ayudarme, por vivir cada uno de mis logros como si fueran suyos y nunca dejaron de alentarme a terminar la carrera.*

*A mi familia, mi tía Raquel, mis tíos: Roberto y Carlos que siempre se han preocupado por mí, por mi educación y bienestar, estoy convencida que son la mejor familia que puedo tener.*

## AGRADECIMIENTOS

Muchas personas pasaron por mi etapa universitaria y dejaron una huella muy significativa, gracias:

A mis queridos amigos Cinthya Carrión, José Silva y Miguel Arimana, por todos sus aportes de conocimientos que me dieron en cada consulta, desinteresadamente; por siempre estar pendientes de mi crecimiento profesional.

A mis queridas amigas Maria Gracia, Xim, Chris, Mila, Lesly, Daniella, José Miguel, Sandro, Alejandro, Nelson y Álvaro por todos los momentos compartidos en la universidad que son y serán inolvidables.

A mis amigas cerperinas, Gabriela, Mary y Soledad por recordarme todos los días mis avances de la tesis, sus comentarios y aportes de conocimiento científico.

A mi hermana de cariño Evelin por ser la persona que siempre vigilaba cada paso universitario que yo daba y lo vivía como momentos nuestros, nunca importo la distancia para siempre contarnos como nos iba y siempre alentarnos a seguir.

A mí querida prima Mónica Valdivia Mayorca; por siempre darme los mejores consejos, certeros todos y por toda esa buena vibra que siempre tiene para todo y todos.

A mí querido primo Luis Mayorca Schuler, que sin el saberlo fue el ejemplo que tome para embarcarme en la aventura de empezar a estudiar a los veintisiete años. Nunca es tarde para aprender.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A mi Asesor de Tesis Blg. Juan Carlos Ramos Gorbeña, mi profundo y sincero agradecimiento, por estar en todo momento pendiente de cada etapa de la elaboración de mi tesis, por toda la paciencia que ha tenido conmigo y entender mi trabajo y adaptarse a mis tiempos. Elegirlo como mi asesor de tesis fue la mejor decisión que tome.

Agradezco a mis profesores queridos, el Dr. Hugo Gonzáles que me enseñó a leer una publicación científica como se debe, a ganarme la nota estudiando y sobre todo investigando, gracias a él conocí al Dr. Walter Gehring – Suiza 2014, un investigador que compartió más de un ejemplar original de sus publicaciones para poder realizar mis trabajos universitarios; al profesor Tomas Agurto por contarnos cada uno de sus anécdota y a través de ellos transmitir los conocimientos, me impulso por la rama de la microbiología, al Quim. Diestra Lara por él aprendí a ser una profesional competente y no limitar mi curiosidad y por último, pero no menos importantes a todos mis profesores por tener la paciencia y compartir todos sus conocimientos.

Agradezco infinitamente a mi alma mater la Universidad Ricardo Palma por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

## RESUMEN

La salmonelosis es una de las enfermedades de transmisiones alimentarias más comunes y ampliamente extendidas, y cada año provoca decenas de millones de casos patológicos en todo el mundo. El control de *Salmonella* en los animales, es considerado como uno de los principales agentes zoonóticos, es un ejemplo de la gran transformación que está sufriendo el sector de la producción animal en su búsqueda por nuevos estándares sanitarios.

Se analizaron 60 muestras de harinas de pescado de diferentes plantas industriales procesadoras de las localidades de Chicama, Huarney e Ilo. , de las cuales 36 muestras fueron inoculadas de manera aleatoria con un mix de cepas tales como *Salmonella entérica* y cepa no objetiva como *E. coli*, también se analizaron muestras control para confirmar la inocuidad de estas. Se analizaron las muestras con el método ISO 6579:2002 y en paralelo el método propuesto MERs. Se obtuvo que para ambos métodos los parámetros estadísticos no variaron; sensibilidad y especificidad tienen un 100%, desviación positiva (falsos positivo) - desviación negativa (falsos negativos) un 0% y una exactitud relativa de 100%. Los resultados sugieren que el método propuesto MERs puede usarse como un método de detección para *Salmonella entérica* en harinas de pescado.

Palabras claves: *Salmonella entérica*., validación, MERs.

## ABSTRAC

Salmonellosis is one of the most common and widespread food-borne diseases, and each year it causes tens of millions of pathological cases worldwide. The control of Salmonella in animals, is considered one of the main zoonotic agents, is an example of the great transformation that the sector of animal production is suffering in its search for new sanitary standards.

Sixty samples of fishmeal were analyzed from different industrial processing plants in the localities of Chicama, Huarmey and Ilo. , of which 36 samples were randomly inoculated with a mix of strains such as enteric Salmonella and non-objective strain such as E. coli, control samples were also analyzed to confirm the innocuousness of these. Samples were analyzed with the ISO 6579: 2002 method and in parallel the proposed method MERs. It was obtained that for both methods the statistical parameters did not vary; Sensitivity and specificity have a 100%, positive deviation (false positive) - negative deviation (false negative) 0% and a relative accuracy of 100%. The results suggest that the proposed method MERs can be used as a detection method for enteric Salmonella in fishmeal.

Key words: Enteric Salmonella., Validation, MERs.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRAC</b>	<b>6</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>10</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>11</b>
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>12</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
2.1    Objetivo General:	15
2.2    Objetivos Específicos:	15
<b>III. HIPOTESIS</b>	<b>16</b>
<b>IV. ANTECEDENTES</b>	<b>17</b>
<b>V. MARCO TEORICO</b>	<b>24</b>
5.1    Normativa ISO	24
5.1.1    ISO 17025:2015	24
5.1.2    Método ISO 6579:2002	25
5.2    Validación	26
5.2.1    METODOS A VALIDAR;	26
5.2.2    Métodos Normalizados;	26
5.2.3    Métodos No Normalizados;	27
5.2.4    Validación Primaria;	27
5.2.5    Validación Secundaria;	28
5.2.6    Validación prospectiva;	28
5.2.7    Validación retrospectiva;	29

<b>5.3</b>	<b>PARAMETROS DE VALIDACION</b>	<b>29</b>
5.3.1	Precisión;	29
5.3.2	Repetibilidad;	29
5.3.3	Reproducibilidad;	30
5.3.4	Robustez;	30
5.3.5	Límite De Detección;	30
5.3.6	Límite De Cuantificación;	30
5.3.7	Especificidad o Selectividad relativa;	31
5.3.8	Sensibilidad relativa;	31
<b>5.4</b>	<b>VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO</b>	<b>31</b>
5.4.1	Método de Referencia;	31
5.4.2	Método alternativo;	31
<b>5.5</b>	<b>Método MERs (Método de Ensayo Rápido – <i>Salmonella</i>):</b>	<b>32</b>
<b>5.6</b>	<b>Salmonella</b>	<b>32</b>
5.6.1	SALMONELOSIS	33
<b>5.7</b>	<b>HARINA DE PESCADO</b>	<b>36</b>
5.7.1	Pienso	36
<b>VI.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>37</b>
<b>6.1</b>	<b>Aseguramiento de la Calidad</b>	<b>37</b>
6.1.1	Aseguramiento de equipos	37
6.1.2	PRUEBA DE ESTERILIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	39
6.1.3	PRUEBA DE VIABILIDAD DE LAS CEPAS	41
<b>6.2</b>	<b>CONTAMINACION ARTIFICIAL DE LA MUESTRA</b>	<b>43</b>
<b>6.3</b>	<b>Pesaje y preparación de la muestra</b>	<b>43</b>
<b>6.4</b>	<b>ANALISIS DE LAS MUESTRAS</b>	<b>43</b>
6.4.1	Fase de Pre-enriquecimiento.	43
6.4.2	Fase de enriquecimiento selectivo	44
6.4.3	Fase de Aislamiento e identificación	44
6.4.4	Fase de Bioquímica y serología.	45
<b>VII.</b>	<b>Resultados</b>	<b>48</b>
<b>7.1</b>	<b>Aseguramiento de calidad</b>	<b>48</b>
7.1.1	De los equipos:	48



7.1.2	De las cepas: _____	51
7.1.3	Del medio de cultivo: _____	53
7.1.4	Del inóculo: _____	53
<b>7.2</b>	<b>RESULTADOS DEL ENSAYO _____</b>	<b>54</b>
7.2.1	TABLA DE CONTINGENCIA DE RESULTADOS EXPERIMENTALES _____	58
7.2.2	PARÁMETROS _____	59
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIONES _____</b>	<b>63</b>
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES _____</b>	<b>65</b>
<b>X.</b>	<b>RECOMENDACIONES _____</b>	<b>67</b>
<b>XI.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS _____</b>	<b>68</b>
<b>XII.</b>	<b>ANEXOS _____</b>	<b>73</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Ciclo Infeccioso de la salmonella (CDC – 2013)</i>	34
<i>Figura 2: Porcentaje de aislamiento no humano, por tipo y fuente, (CDC – 2011)</i>	35
<i>Figura 3: Etapas de procesos de producción de harina de pescado.</i>	36
<i>Figura 4: Modelo de Incubadora con 10 puntos de verificación..</i>	38
<i>Figura 5: Pruebas bioquímicas de verificación de la cepa Salmonella enterica. Control Positivo)</i>	40
<i>Figura 6: Pruebas bioquímicas de verificación de la cepa. E. coli. (Control Negativo).</i>	40
<i>Figura 7: Prueba de viabilidad</i>	42
<i>Figura 8: Pase de Caldo a agares</i>	44
<i>Figura 9: Fase de Aislamiento selectivo</i>	45
<i>Figura 10: Pase a batería de bioquímicas</i>	45
<i>Figura 11: Pruebas serológicas</i>	46
<i>Figura 12: Aglutinación de Salmonella enterica en serología H.</i>	46
<i>Figura 13: Flujograma de Método ISO vs Método MERs</i>	47
<i>Figura 14: Comparación de tres cepas diferentes en agar RAMBASH (Rambash A. - 1990)</i>	73
<i>Figura 15: Kit Agar RAMBASH (Presentación comercial)</i>	74

# INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Verificación de Incubadora.</i>	49
<i>Tabla 2: Verificación de Balanzas</i>	50
<i>Tabla 3: Verificación de Potenciómetro.</i>	51
<i>Tabla 5: Productividad del Agar.</i>	53
<i>Tabla 6: Concentración del Inoculo</i>	54
<i>Tabla 7: Muestras – Método Referencial ISO</i>	55
<i>Tabla 8: Muestras – Método a Validar MERs</i>	56
<i>Tabla 9: Esquema de tabla de contingencia</i>	57
<i>Tabla 10: Tabla de contingencia de resultados experimentales método referencial ISO</i>	58
<i>Tabla 11: Tabla de contingencia de resultados experimentales método a validar MERs</i>	58
<i>Tabla 12: Sensibilidad Relativa- Metodo Referencial vs MERs</i>	59
<i>Tabla 13: Especificidad Relativa- Método Referencial vs MERs</i>	60
<i>Tabla 14: Desviación Negativa (FN) - Método Referencial vs MERs</i>	60
<i>Tabla 15: Desviación Positiva - Método Referencial vs MERs</i>	61
<i>Tabla 16: Exactitud Relativa- Método Referencial vs MERs</i>	62

# I. INTRODUCCION

Los análisis microbiológicos de materias primas usadas en la elaboración de alimentos para animales, son importantes para garantizarles a los comercializadores, compradores y consumidores que estos se encuentran libres de microorganismos que puedan alterar las características organolépticas e inocuas del producto. Con estos análisis se puede detectar agentes patógenos, causantes de enfermedades. Por tanto, es cuando radica la importancia de los análisis microbiológicos asegurando la calidad de las materias primas evitando que se conviertan en vehículo de enfermedades como la salmonelosis, entre otras enfermedades de transmisión alimentaria.

La salmonelosis, es causada por la bacteria *Salmonella*; esta es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más común y ampliamente extendida por todo el mundo (OMS. 2013), y afecta tanto al hombre como a los animales (OIE. 2008).

Diversos factores ambientales y de manejo se han relacionado a elevados niveles de *Salmonella* en la población animal (Márquez, 2008). En muchos de los casos la infección se le atribuye a la ingesta de agua o alimentos contaminados con *Salmonella* (Figueroa, 1984), ejemplo de ello es que los animales se pueden infectar cuando son alimentados con piensos contaminados (Andreoletti, 2008)

Para controlar el incremento de este tipo de enfermedades, se han implementado normas alimentarias que establecen niveles permisibles o ausencia de determinados microorganismos en los alimentos, esto ha obligado a las industrias y a los comercializadores de alimentos a realizar análisis microbiológicos a sus productos. Desafortunadamente para ellos el análisis para la detección de *Salmonella* spp es bastante largo y dispendioso. Los métodos microbiológicos tradicionales considerados de

referencia, utilizados actualmente para la detección de *Salmonella spp.* requieren de diversas etapas de análisis hasta llegar a la confirmación del microorganismo 8 a 14 días después de realizar la toma de muestra. Este tiempo causa retrasos en la utilidad de la materia prima empleada para elaborar los piensos, ocasionando pérdidas económicas en las empresas, es ahí cuando radica la importancia y necesidad de emplear métodos alternativos de análisis.

La validación de métodos y tecnologías para la detección y aislamiento de *Salmonella spp.* en alimentos propone ventajas frente a los métodos tradicionales o de referencia, como son la rapidez, automatización e interpretación de resultados (Fornés, 2008). Sin embargo, antes de hacer uso de un método propuesto como una alternativa este debe ser validado para garantizar que el ensayo es útil para el fin que se quiere validar y que se obtienen resultados confiables y comparables con los obtenidos por el método de tradicional.

El presente trabajo se realizó con el fin de validar el método de ensayo rápido (MERs) para la detección de *Salmonella enterica* en harina de pescado. Para su desarrollo se analizaron 60 muestras de harina de pescado de tres zonas diferentes del litoral peruano, inoculadas aleatoriamente con cepa objetiva (*Salmonella enteritidis*) y no objetiva (*Escherichia coli*) con el método MERs y se realizó análisis en paralelo con el método tradicional (norma ISO 6579:2002). Ambos métodos se cumplen realizando las pruebas bioquímicas y serológicas.

Con los resultados obtenidos en los análisis se determinaron varios parámetros como sensibilidad y especificidad relativa, también se evaluó su eficiencia que fue de 100%. Estas medidas permiten establecer que método MERs es eficaz y que se obtienen resultados confiables.

Además, se realizó un análisis estadístico (Mc Clure, F.D., 1990) para determinar la diferencia que existe o no entre los resultados obtenidos en

ambos métodos. Se puede establecer que no existen diferencias significativas entre los métodos.

Después de evaluar el método ISO y analizando los resultados obtenidos en los parámetros evaluados, es posible decir que si se valida el método y que puede ser implementado para la detección de *Salmonella spp* en materias primas para la elaboración de pienso para animales.

## II. OBJETIVOS

### **2.1 Objetivo General:**

Validar el método de ensayo rápido (MERs) para la detección e identificación de *Salmonella enterica* en la matriz harina de pescado.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

Aplicar la metodología tradicional para la detección e identificación de *Salmonella enterica* en la matriz harina de pescado.

Aplicar la metodología de ensayo rápido (MERs) para la detección e identificación de *Salmonella enterica* en la matriz harina de pescado.

Comparar ambos resultados obtenidos mediante la aplicación de las metodologías y determinar la eficiencia del método de análisis propuesto siguiendo los parámetros ya establecidos según en la ISO - 17025.

### III. HIPOTESIS

La validación del método MERs para la detección e identificación de *Salmonella enterica* en la matriz harina de pescado y aplicación de este disminuye el tiempo de respuesta significativamente.



## IV. ANTECEDENTES

Andrews *et al.* 2014. El método tradicional para la detección de *Salmonella spp.* en alimentos utilizado en el Laboratorio de Microbiología de la SEREMI de salud RM, está basado en lo descrito en el capítulo V del Bacteriological Analytical Manual de la Food and Drug Administration (FDA). Este método tiene una duración de seis días y consta de cuatro fases: i) pre-enriquecimiento no selectivo, ii) enriquecimiento selectivo, iii) siembra e identificación y iv) confirmación de identidad. Los resultados obtenidos fueron de tipo cualitativo, es decir, presencia o ausencia de *Salmonella spp.* en 25 g. de alimento.

Fornés, 2014. Indica que una validación se basa en la comprobación que se realiza para determinar si un método alternativo tiene resultados similares a los obtenidos por un método de referencia. Es un procedimiento extenso que consta de dos partes: una primera etapa de validación por parte de un laboratorio experto, en donde se caracteriza el método, y una segunda etapa que incorpora la realización de un ejercicio colaborativo, en la cual participan distintos laboratorios a nivel mundial. Para la validación de un método, se utiliza un procedimiento establecido y reconocido internacionalmente, por ejemplo, la norma ISO 16140.

Paucar Menacho, Luz 2014. Propone un plan HACCP en la que menciona partes principales del producto en cuestión como es ficha técnica de la harina de pescado. Requisitos físicos y químicos normados por SNI la Sociedad Nacional de Industrias ente regulador del Santa regidos por ITP Instituto Tecnológico Pesquero del Perú.

OMS 2013. La OMS promueve el fortalecimiento de los sistemas de inocuidad de los alimentos, las buenas prácticas de elaboración y la información de los vendedores y consumidores acerca de la adecuada manipulación de los alimentos, y la prevención de la contaminación. La

información de los consumidores y la capacitación de los manipuladores de alimentos para la manipulación segura de los productos son algunos de los medios más eficaces para prevenir enfermedades de transmisión alimentaria, entre ellas la salmonelosis. Por medio de la Red Mundial sobre Infecciones de Transmisión Alimentaria, la OMS refuerza y mejora las capacidades de los laboratorios nacionales y regionales en lo relativo a la vigilancia de la *Salmonella spp.* y de otros patógenos de transmisión alimentaria y a la resistencia de *Salmonella* y *Campylobacter* a los antimicrobianos en las personas, alimentos y animales.

Alverti, 2012. Trabajo la prevención de la presencia de *Salmonella spp.* en la carne molida destinada a consumo minorista. Desarrollaron una técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR) con agentes intercalantes para la detección de *Salmonella spp.* y realizaron una validación intra-laboratorio. El límite de detección fue  $10^4$  UFC/20  $\mu$ l de mezcla de reacción. En esta etapa la técnica presentó 100% de exclusividad y exclusividad. Compararon el desempeño de la técnica contra una PCR de punto final y una RT-PCR comercial mediante el análisis de 92 muestras de carne molida obtenidas de carnicerías de la ciudad de Berisso. Durante el muestreo realizaron una encuesta al responsable del comercio. Obtuvieron 13 (14%) muestras positivas por aislamiento y por RT-PCR comercial y ocho (8,7%) muestras positivas al utilizar PCR de punto final y la técnica desarrollada. Aislaron 5 serotipos de *Salmonella*.

Estrada y Valencia, 2012. Las bacterias del género *Salmonella* pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos Gram negativo, anaerobios facultativos, no formadores de esporas y, en general, son móviles mediante flagelos peritricos. Son bacterias mesófilas, que tienen un rango de crecimiento entre 5 y 46°C, con un óptimo de 35°C y 37°C, y son destruidas mediante el proceso de pasteurización. Además, presentan una alta sensibilidad a pH menor o igual a 4,5 y resisten varios días en estados de congelación y deshidratación. Tienen la capacidad de multiplicarse en una gran variedad de alimentos, sin embargo, no pueden multiplicarse en

aquellos con actividad de agua ( $A_w$ )  $<0,94$ , en especial con pH igual o menor a 5,5

FAO 2002. El principal motivo de preocupación respecto de la inocuidad de la utilización de la harina de pescado para los seres humanos ha sido siempre y sigue siendo la contaminación de *Salmonella*. Antes de su comercialización, la harina de pescado es objeto de un muestreo y un análisis de detección de *Salmonella*. Su presencia puede dar lugar a la contaminación de animales y productos lácteos, que a su vez pueden causar la salmonelosis, una infección transmitida por los alimentos que puede ser grave para los seres humanos, especialmente para los ancianos y los niños pequeños. Además, algunas especies de *Salmonella* causan enfermedades dañinas para la ganadería.

Schlicht Stange A. 1997. Como aporte al conocimiento de técnicas de aislamiento de *Salmonella spp.* en harina de pescado, compararon los resultados de los análisis realizados a muestras de harina de pescado previamente diagnosticadas positivas a *Salmonella spp.* Realizaron 20 análisis de muestras distintas y 10 repeticiones de una sola muestra según la técnica tradicional estandarizada por SERNAP (norma ISO 6579/90) y la técnica de separación inmunomagnética (IMS). Determinaron la presencia/ausencia de *Salmonella spp.* según la metodología convencional pesando 25 g de muestra añadiéndose a 225 mL de caldo de enriquecimiento no selectivo, incubándose a 37°C por 20 horas. El enriquecimiento selectivo prosigue sembrando 1 mL de este caldo en el caldo selenito cisteína, incubando a 37°C por 24 horas y 0,1 mL en el medio de Rappaport-Vassiliadis, incubando a 42°C por 24 h. Se aísla la bacteria sembrando en placa en los agares selectivos Rambach y XLD, incubándolos a 37°C durante 24 horas y las colonias sospechosas se someten a confirmación bioquímica. La técnica de IMS se basa en un tipo diferente de enriquecimiento selectivo requiriendo también de una etapa previa de enriquecimiento no selectivo, incubándose durante 5 y 20 Horas a 37°C. A partir del caldo incubado se obtienen 2 mL y se añaden 100 µl de

la suspensión de perlas magnéticas recubiertas de anticuerpos anti-*Salmonella spp.*, se agitan a temperatura ambiente durante 1 hora. El aislamiento presuntivo y la confirmación bioquímica se realizan siguiendo los mismos procedimientos de la técnica tradicional. En los 20 análisis de muestras diferentes los resultados evidenciaron la presencia de *Salmonella spp.* en 5 muestras del total analizadas por la técnica tradicional (5/20), en cambio usando la IMS se aisló *Salmonella spp.* en 3 muestras del total (3/20). En la prueba de repetibilidad, la técnica convencional determinó positivas 6 muestras del total (6/10), mientras que la IMS aisló *Salmonella spp.* en 8 oportunidades (8/10) del total de ensayos. Ambas técnicas obtuvieron resultados similares de diagnóstico y una repetibilidad equivalente, siendo la IMS una alternativa confiable en los análisis rutinarios de *Salmonella spp.*

Biomeriux 2013. Este método es un ensayo inmunoenzimático que detecta antígenos de *Salmonella spp.* por medio de la técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) (Biomérieux, 2013). Consta de un kit que está compuesto por cartuchos sellados en donde se deposita la muestra que se analiza y que poseen reactivos listos para su utilización, y por conos (SPR®) con anticuerpos contra *Salmonella spp.* adsorbidos en su superficie interna .

La muestra debe ser pre enriquecida en agua peptonada tamponada (APT) y enriquecida selectivamente en caldo SX2. Posteriormente, se transfieren 0,5 ml del caldo, al pocillo abierto del cartucho VIDAS®. El equipo dosifica este contenido en el resto de los recipientes del cartucho, los cuales poseen reactivos listos para su utilización. A través de una sucesión de aspirado y expulsado, los antígenos toman contacto con los anticuerpos adsorbidos en la pared del cono. Los antígenos no unidos a anticuerpos, se eliminan mediante lavados sucesivos. Luego, anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina, se unirán a los antígenos de *Salmonella spp.* que a su vez estén unidos al anticuerpo adsorbido al cono. El conjugado no unido a antígeno, se elimina por nuevos lavados. Al final del proceso, el sustrato 4-metil-

umbeliferil fosfato, es aspirado y expulsado del cono. La enzima del conjugado cataliza la hidrólisis de ese sustrato, obteniéndose un producto fluorescente. El equipo analiza la fluorescencia obtenida, le asigna un valor y lo compara con referencias internas para finalmente arrojar un resultado cualitativo de la muestra (positivo o negativo a *Salmonella spp.*). Todas las etapas del ensayo son realizadas automáticamente por el equipo VIDAS®. Posee valores de especificidad relativa de 99,0 %, sensibilidad relativa de 99,1 % y exactitud relativa de 99,0 % (AFNOR, 2005).

OMS 1988. En este informe se recogen las conclusiones y recomendaciones de un grupo internacional de expertos convocado por la OMS para evaluar la eficacia de los procedimientos en uso para proteger a la población contra los brotes de enfermedades causados por los manipuladores de alimentos. El informe se centra en si el reconocimiento médico sistemático de los manipuladores de alimentos basta para evitar, o por lo menos reducir al mínimo, la contaminación alimentaria. Para responder a esta pregunta, después de examinar todas las infecciones e intoxicaciones transmisibles por los manipuladores de alimentos, se analiza la eficacia de los reconocimientos, los historiales médicos, los frotis faríngeos, los análisis de sangre, los exámenes radiológicos, las pruebas cutáneas y el examen de las heces para detectar a los portadores sintomáticos o asintomáticos. Basándose en estos datos, el informe llega a la conclusión de que los reconocimientos médicos sistemáticos de los manipuladores de alimentos, antes de su contratación y después de la misma, son ineficaces y por tanto innecesarios. Las demás secciones están dedicadas a otras medidas preventivas, como vigilancia de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, el uso del sistema de puntos críticos de control para el análisis de riesgos como método racional y moderno para prevenir dichas enfermedades y diversas medidas en el marco de la industria alimentaria.

OMS 2016.; *Salmonella* es una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas.

Si bien la mayoría de los casos de salmonelosis son leves, algunas veces la enfermedad puede ser mortal. La gravedad de la enfermedad depende de factores propios del huésped y del serotipo de *Salmonella*.

La resistencia los antimicrobianos es un problema de salud pública mundial. *Salmonella* es uno de los microorganismos entre los que han aparecido algunos serotipos resistentes a los antimicrobianos que afectan a la cadena alimentaria.

Como medidas de prevención contra la salmonelosis se recomiendan prácticas básicas de higiene de los alimentos, como su cocción completa.

ICMSF 1975. Indica que todas las *Salmonellas* deberían ser consideradas potencialmente patógenas para el hombre. Ya que la única vía de contaminación por este microorganismo es vía oral es de suma importancia vigilar los alimentos para detectar la presencia de estos. A pesar de todo, aún no ha sido posible que desarrollen un método que garantice la recuperación de todos los serotipos de *Salmonella* en los diferentes tipos de productos alimenticios que han sido sometidos a diferentes condiciones de almacenamiento, conservación y preparación. Sugiere para el aislamiento e identificación de *Salmonella* seis etapas sucesivas las cuales son; Enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo, siembra en placa de medio sólidos selectivos y diferenciales, estudios de las características bioquímicas de las colonias sospechosas en los medios adecuados, análisis antigénicos en dos faces y tipificación por medio de bacteriófago. Estos pasos garantizan identificar la cepa sospechosa como miembro del género *Salmonella*.

Riquelme, 2015. Indica que después de tantos cálculos y conteos concluye que la dosis infectiva de *Salmonella spp.* está determinada en 10<sup>6</sup> UFC, sin embargo, esto depende de las características del individuo, los alimentos y la cepa involucrada, por lo que una dosis de entre una y diez células también pueden ser causante de salmonelosis. Por tal motivo, la sola

presencia de *Salmonella spp.* es considerada peligrosa para la salud humana.

## V. MARCO TEORICO

### 5.1 Normativa ISO

La Organización Internacional de Normalización es una organización para la creación de estándares internacionales compuesta por diversas organizaciones nacionales de estandarización. Fundada el 23 de febrero de 1947 en Londres – Reino Unido.

#### 5.1.1 ISO 17025:2015

De acuerdo a la Norma Técnica ISO/IEC 17025, validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto (NTP-ISO/IEC 17025:2005). Es un proceso basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante el cual se pone de manifiesto que un procedimiento analítico determinado posee características de funcionamiento adecuadas a la aplicación que se le quiere dar. La validación de un método de ensayo constituye una de las actividades necesarias para garantizar la validez de los resultados de un laboratorio y es internacionalmente reconocida como criterio imprescindible para el establecimiento de un completo sistema de calidad.

De forma general, la validación de procedimientos analítico se realiza cuando se pone en marcha una técnica de ensayo. El objetivo es garantizar que los métodos cumplan determinados criterios (Camaró-Sala, et al 2014). La data que se analice en un proceso de validación debe ser tan amplia como se requiera para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de la aplicación dados. El laboratorio registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la



validación y una declaración sobre la capacidad del método para el uso previsto (ISO/IEC 17025:2005).

En el proceso de validación del método está implícito que los estudios para determinar los parámetros de desempeño se realizan usando equipos dentro de especificaciones, que están trabajando correctamente verificados y calibrados adecuadamente. Asimismo, el analista que realiza los estudios debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y debe poseer suficiente conocimiento sobre el trabajo a realizar con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio.

### **5.1.2 Método ISO 6579:2002**

Método tradicional estandarizado para análisis microbiológicos de productos alimentos y de alimentación animal - Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. - Enmienda 1: Anexo D: Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria.

Describe un esquema general que consiste de 5 pasos básicos:

- a) Pre-enriquecimiento, es el paso en donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas, logrando de esta manera una condición fisiológica estable.
- b) Enriquecimiento selectivo, se logra a partir de un medio de cultivo que conjunte dos condiciones, por un lado debe incrementar las poblaciones de *Salmonella* y por otro inhibir otros microorganismos presentes en la muestra.

- c) Selección en medios sólidos, este punto se deriva directamente del anterior y se utilizan medios selectivos, que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y que permitan el reconocimiento visual característico de colonias sospechosas.
- d) Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.
- e) Serotipificación, es una técnica inmunológica (antígeno-anticuerpo) que permite la identificación específica de un microorganismo. (ISO 17364-2014)

## **5.2 Validación**

### **5.2.1 METODOS A VALIDAR;**

La norma NTC ISO 17025 señala que “el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto”.

En función del método que se emplee el laboratorio deberá elegir un tipo de validación. Por ello es necesario las modalidades de validación y los diferentes tipos de métodos existentes, según sean normalizados o no (Camaró-Sala, et al 2014).

### **5.2.2 Métodos Normalizados;**

Son métodos desarrollados por un organismo de normalización o por otras organizaciones bien establecidas, cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico en cuestión. Estos métodos normalizados

son considerados como de referencia, ya que pueden ser utilizados para evaluar otros métodos desarrollados para la misma determinación. No requieren una validación completa, pero sí la confirmación de su correcta aplicación. Se trata de métodos que el laboratorio aplica como ya está descrito en las normas (Camaró-Sala, et al 2014).

### **5.2.3 Métodos No Normalizados;**

Métodos no estandarizados o desarrollados por los laboratorios o por terceros, o que son adaptados para el laboratorio a partir de un método normalizado y validado (ILAC G18:04, 2010).

### **5.2.4 Validación Primaria;**

Es un proceso exploratorio que tiene como meta establecer los límites operacionales y las características de desempeño de un método nuevo. Debe dar origen a especificaciones numéricas y descriptivas para el desempeño e incluir una descripción detallada y precisa del objeto de interés. Corresponde con la validación inicial que deben llevar a cabo los laboratorios y casas comerciales que diseñan un equipo diagnóstico, una prueba nueva o la unión en un solo protocolo de varios métodos normalizados o no. También corresponde con la caracterización que debe realizarse a una técnica que se desarrolla en un laboratorio para su propio uso (Camaró-Sala, et al 2014).

Realizada con un protocolo extenso en el que se contempla una primera fase de validación por parte de un laboratorio experto y una segunda fase que incluye la realización de un ejercicio colaborativo con la participación de varios laboratorios, y que utiliza un diseño de experiencias y unos criterios de evaluación de resultados preestablecidos y reconocidos internacionalmente (Fornés, 2008).

### **5.2.5 Validación Secundaria;**

Llamada también verificación, tiene lugar cuando un laboratorio pone en marcha un método desarrollado por otros. La validación secundaria tiene como objetivo principal recopilar los datos que permitan demostrar que el laboratorio es capaz de cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria (PARRA & SALAZAR 2007).

Se trata de la validación que hay que llevar a cabo cuando se introduce un equipo diagnóstico, método o prueba en un laboratorio clínico y que ya está validada primariamente por organizaciones internacionales (Camaró-Sala, et al 2014). Consiste básicamente en comprobar que el laboratorio es capaz de cumplir con los requisitos de funcionamiento del método previamente establecidos en las condiciones habituales de trabajo (ILAC G18:04, 2010).

Normalmente la verificación supone determinar el cumplimiento de menos parámetros y hacer menos mediciones de cada parámetro que si se tratara de una validación. Los resultados de la verificación pueden diferir levemente de los obtenidos en la validación, pero debe determinarse si son aceptables teniendo en cuenta el objetivo que se persigue al utilizar el método (UNODC. 2010).

### **5.2.6 Validación prospectiva;**

Es el establecimiento documentado de la evidencia de que un sistema hace lo que debe hacer basándose en un protocolo planificado, se realiza en productos nuevos y se lleva a cabo antes de la comercialización del producto. En la validación prospectiva de análisis, un plan experimental llamado Protocolo de Validación es ejecutado el cual es determinado en base a la información de apoyo recopilada de los resultados de ensayos experimentales previos (Acosta & Ramírez. 2007).

### **5.2.7 Validación retrospectiva;**

Estudio para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que establece previsto sobre la base de una revisión y análisis de información histórica, proporcionada por los registros de producción y de control de calidad (Acosta & Ramírez. 2007).

## **5.3 PARAMETROS DE VALIDACION**

Los parámetros de validación son aquellas características del método para las que:

- Se define requisitos
- Se realizan experimentos para conseguirlos
- Se valoran los resultados obtenidos frente a requisitos para poder declarar válido el método (Laso. 2005)

### **5.3.1 Precisión;**

Grado de concordancia entre resultados de ensayo independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas. La precisión no se relaciona con el valor verdadero o el valor especificado. La precisión depende solo de la distribución de errores aleatorios y no tiene ninguna relación con el valor verdadero o el valor especificado. Se expresa como coeficiente de variación (Camaró-Sala, et al 2014).

### **5.3.2 Repetibilidad;**

Grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo elemento mensurado realizadas bajo las mismas condiciones de medición (GTC 84, 2003).

### **5.3.3 Reproducibilidad;**

Grado de concordancia entre los resultados de las mediciones en el mismo elemento mensurado realizadas bajo condiciones de medición alteradas (GTC 84, 2003).

### **5.3.4 Robustez;**

Insensibilidad de un método analítico frente a pequeños cambios en el procedimiento (GTC 84, 2003).

### **5.3.5 Límite De Detección;**

La menor cantidad o concentración de un analito que puede detectarse de manera fiable o diferenciada por un método específico (A.E.A.S. 2012).

Es la menor magnitud que puede examinarse de un analito (por ejemplo, microorganismo, etc.), que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. En el caso de los cultivos microbiológicos es el número mínimo de organismos que pueden ser detectados en una cantidad de muestra con una probabilidad dada, pero en cantidades que no pueden ser claramente cuantificadas (Camaró-Sala, *et al* 2014).

### **5.3.6 Límite De Cuantificación;**

La concentración más baja del análisis que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad, dentro de una matriz en particular y por un método específico (A.E.A.S. 2012a).

### **5.3.7 Especificidad o Selectividad relativa;**

La capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en la presencia de otros compuestos en la matriz bajo condiciones de prueba establecidas (GTC 84, 2003).

### **5.3.8 Sensibilidad relativa;**

En general, es la fracción total del número de resultados positivos asignados correctamente con el método utilizado (Camaró-Sala, *et al* 2014).

## **5.4 VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO**

### **5.4.1 Método de Referencia;**

Método reconocido internacionalmente y ampliamente aceptado (INS, 2014).

### **5.4.2 Método alternativo;**

Método de análisis que demuestra o estima para una categoría dada de productos, el mismo analito de la misma forma que el método de referencia (INS, 2014).

La validación de un método alternativo es el procedimiento para demostrar si los resultados obtenidos por dicho método son comparables con aquellos obtenidos utilizando los métodos de referencia (Ortega et al, 2010).

El objetivo de la verificación es comprobar que podemos detectar un nivel suficientemente bajo de microorganismos en las diferentes matrices objeto de análisis.

La validación de los métodos alternativos comprende un análisis, dependiendo del tipo de método (cualitativo o cuantitativo), y del estudio, teniendo en cuenta la fase, si es intra o interlaboratorial (Fornés. 2014).

### **5.5 Método MERs (Método de Ensayo Rápido – *Salmonella*):**

Método propuesto para análisis microbiológicos en matriz harina de pescado. Este método usa un agar selectivo cromogénico (Rambash) que debido a los sustratos nutritivos permiten que las enterobacterias se multipliquen con facilidad. El sodio desoxicolato inhibe la flora grampositiva, el Propelinglicol en presencia de salmonela y un indicador de ph evidencian la presencia del analito por medio de colonias rojas; para diferenciar la presencia de coliformes este agar tiene  $\beta$ -galactosidasa el cual los evidencia como colonias verde azuladas. Luego de un proceso de recuperación del microorganismo se purifica el cultivo y en forma paralela se realiza la fase de bioquímica y primera serología, de tal manera que el cultivo es fresco y no se atenúa ninguna de sus características, por lo tanto el resultado se emite en seis días.

### **5.6 Salmonella**

Las bacterias del género *Salmonella* pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos Gram-negativo, anaerobios facultativos, no son formadores de esporas y, en general, son móviles mediante flagelos peritricos (Martínez, 2011; Estrada y Valencia, 2012). Son bacterias mesófilas, que tienen un rango de crecimiento entre 5 y 46 °C,



con un óptimo de 35 °C y 37 °C, y son destruidas mediante el proceso de pasteurización (Estrada y Valencia, 2012). Además, presentan una alta sensibilidad a pH menor o igual a 4,5 y resisten varios días en estados de congelación y deshidratación. Tienen la capacidad de multiplicarse en una gran variedad de alimentos. (Estrada y Valencia, 2012). La clasificación taxonómica de este género es bastante compleja, sin embargo, actualmente se describen dos especies de *Salmonella*; *S. enterica* y *S. bongori*, siendo la primera dividida en seis subespecies (Méndez et al., 2011; Parra et al., 2002). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* es, epidemiológicamente, la más importante y representa el 99 % de los serotipos aislados (Méndez et al., 2011).

Las *Salmonellas* forman un grupo antigénico complejo con más de 2400 serovariedades diferenciadas por antígenos somáticos (O) de naturaleza lipopolisacárida, y por antígenos flagelares (H) de naturaleza proteica (VIDAS *Salmonella* 30702).

### **5.6.1 SALMONELOSIS**

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa del hombre y los animales causada por microorganismos de dos especies de *Salmonella* (*Salmonella enterica* y *S. bongori*) (OIE. 2008).

La gastroenteritis por *Salmonella* es una zoonosis que se transmite por la ingestión de alimentos, agua o fómites contaminados por las heces de un animal o persona infectados y constituye una pandemia de distribución mundial (Gil-Seta et al, 2002).

Aunque fundamentalmente son bacterias intestinales, *Salmonella* está muy distribuida en el ambiente y se encuentran con frecuencia en vertidos de granjas, en las aguas residuales humanas y en cualquier material con contaminación fecal (OIE. 2008).

En todos los países existe la salmonelosis, pero parece tener una mayor prevalencia en áreas de producción animal intensiva, especialmente de cerdos, de terneros y de algunos tipos de aves criadas en cautividad. Muchos animales, en especial los cerdos y las aves, pueden estar infectados sin manifestar la enfermedad clínica. Tales animales pueden ser importantes en la difusión de la enfermedad entre explotaciones y como fuentes de contaminación alimentaria y de infección humana (OIE. 2008).

La alimentación animal juega un papel importante en la exposición y transmisión en granjas de contaminaciones microbianas, especialmente *Salmonella*, al tratarse de una vía principal de introducción de infecciones. Aunque se describen distintos rangos de contaminación entre países, la contaminación por *Salmonella* es relativamente alta y puede aislarse en una amplia variedad de alimentos destinados a animales, tanto de origen vegetal como animal (Valverde, 2012). Los animales se pueden infectar cuando se les alimenta con piensos contaminados por *Salmonella*. Se ha observado la transmisión de *Salmonella* de los piensos a los animales que los consumen y a los productos derivados de estos animales (Andreoletti, 2008).

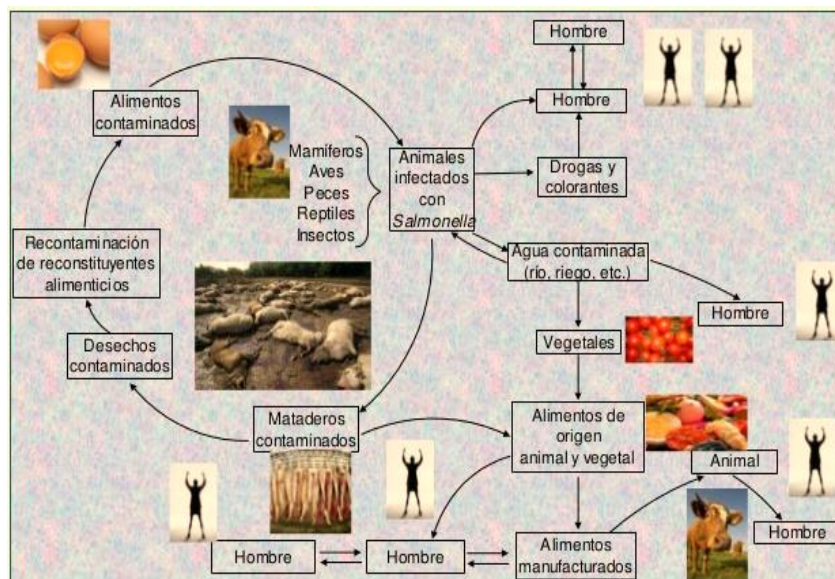


Figura 1: Ciclo Infeccioso de la salmonella (CDC – 2013)

**Figure 8 - Percentage of non-human isolates, by type and source, reported by the National Veterinary Services Laboratories, USDA-FSIS, 1968-2011**

N=37,557

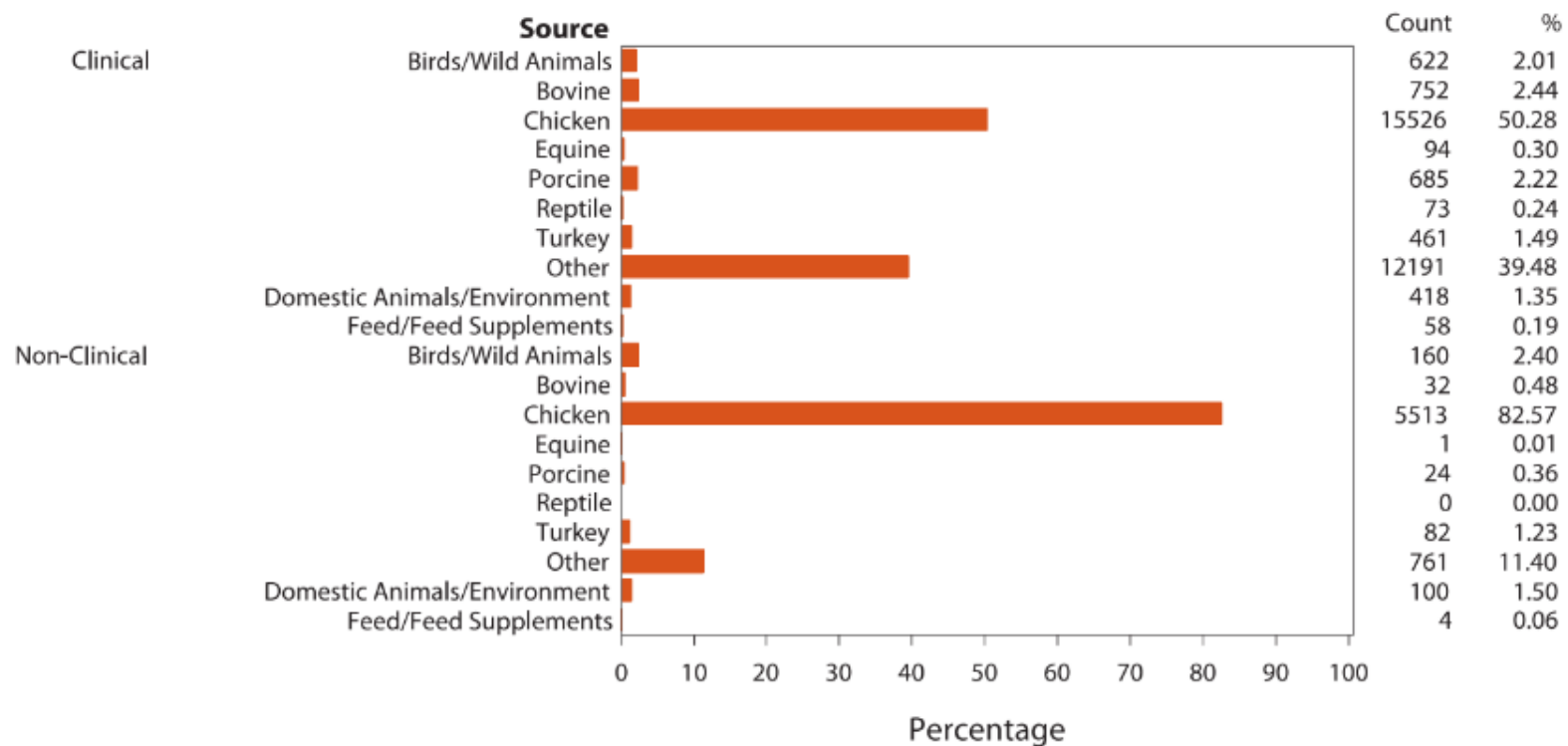


Figura 2: Porcentaje de aislamiento no humano, por tipo y fuente, (CDC – 2011)

## 5.7 HARINA DE PESCADO

Liofilizado obtenido de las partes solidas del pescado; este producto se obtiene por medio de un conjunto de procesos que se llevan a cabo a altas temperaturas. (Europeo, P. 2002).

### 5.7.1 Pienso

Producto principal es la harina de pescado es un factor clave en la producción ganadera, tanto desde el punto de vista económico como desde el punto de vista sanitario, pudiendo ser el responsable de la transmisión de sustancias indeseables o enfermedades infecciosas transmisibles al ser humano. También se le ha considerado responsable de participar en la transmisión de otros agentes zoonóticos, como *Salmonella* o *E. coli*.

Se ha observado la transmisión de *Salmonella* de los piensos a los animales que los consumen y a los productos derivados de estos animales (Valverde, 2012). El control de la contaminación del pienso, comienza con el control de las materias primas, siguiendo a lo largo de todo el proceso de fabricación.

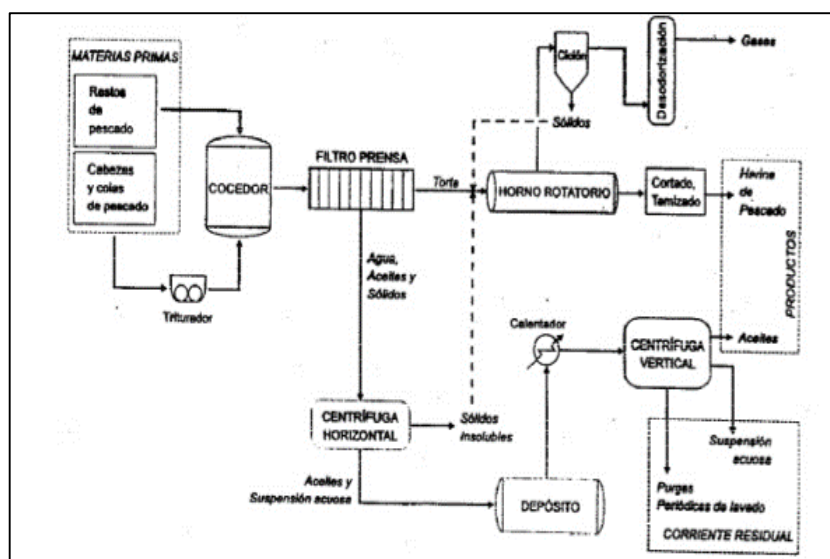


Figura 3: Etapas de procesos de producción de harina de pescado.

## VI. MATERIALES Y METODOS

La validación de la técnica MERs como método alternativo para la detección de *Salmonella enterica*. en harina de pescado para la elaboración de pienso (alimento concentrado) para animales se realizó en paralelo con la detección de *Salmonella entérica* por el método tradicional ISO 6579:2002.

Las ensayos se realizaron a partir de treinta muestra para cada metodología de la cuales 18 fueron inoculadas de manera artificial y aleatoria y 12 no fueron inoculadas, para ellos se usaron las cepas objetiva de *Salmonella spp* y cepa no objetiva como *E. coli*. Con estas muestras se trabajó por las dos metodologías.

### **6.1 Aseguramiento de la Calidad**

#### **6.1.1 Aseguramiento de equipos**

Todo ensayo que se somete a validar requiere que los equipos estén funcionando en perfecto estado y estén cumpliendo las temperaturas y condiciones que se establece en el método. (ISO 17025:2000).

Se verificaron los siguientes equipos antes y durante el periodo del ensayo.

##### **6.1.1.1 Verificación de Incubadoras y Baño de agua.**

Se verificó que los equipos; incubadoras, baño de agua y congeladoras estuvieran dentro del rango de temperaturas de trabajo.

Estos equipos se verificaron haciendo uso de una termocupla y un termopar a manera que el termopar se colocó en uno de los diez puntos y se tomó la temperatura.

Ver Tabla 1: Verificación de Incubadoras/ Baño de agua.

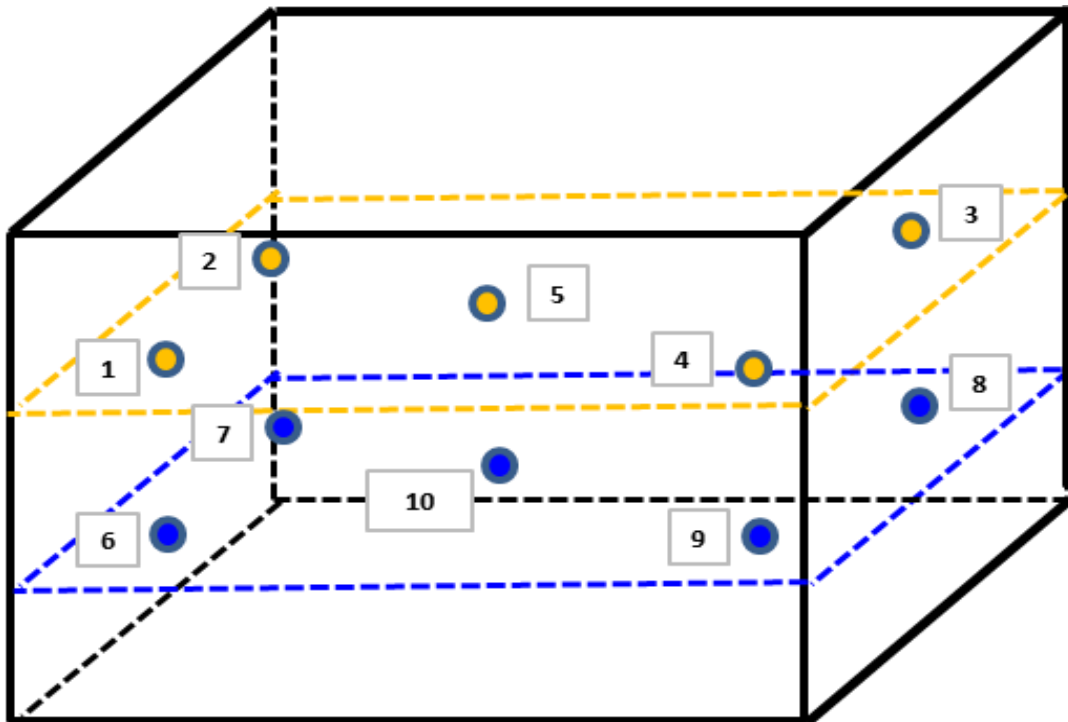


Figura 4: Modelo de Incubadora con 10 puntos de verificación..

#### 6.1.1.2 Verificación de balanza

Se realizó la verificación de la balanza (450.00g max.) haciendo uso de pesas patrón las cuales son verificadas y certificadas por INDECOPI, se procedió a realizar una serie de 20 pesadas por cada pesa patrón es decir 5gr, 50gr y 200gr de tal manera que estas demostraran que la balanza está en óptimas condiciones para continuar con la etapa de pesaje.

Ver Tabla 2: Verificación de Balanza

### **6.1.1.3 Verificación del Potenciómetro.**

Para la verificación del potenciómetro se usó tres buffer de pH conocidos y certificados con la ISO que corresponde; pH 4.0, pH 7.0 y pH 10.0 a manera que el equipo reconociera el pH que se está probando.

Ver Tabla 3: Verificación de Potenciómetro.

## **6.1.2 PRUEBA DE ESTERILIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

Para la evaluación microbiológica de medios de cultivos líquidos y de reactivos se utilizaron dos microorganismos de prueba: un control positivo (microorganismo que se desea recuperar o determinar) y un control negativo (microorganismo que se desea inhibir total o parcialmente y para los reactivos es el microorganismo que dé una reacción diferente al microorganismo a determinar).

Para ello se preparó cultivos de 24 h de los microorganismos de prueba, en caldo no selectivo (BHI) también se preparó tubos de ensayo y placas petri con el medio de cultivo y reactivos que se evaluaron.

Se inoculo los cultivos de los microorganismos de prueba con un asa de Kolle en los medios de cultivo empleados en la evaluación. Se llevó a incubar durante 24hr a  $35^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . De la misma manera se evaluaron los agares y caldos que correspondían a la fase de bioquímica usando microorganismos que dieran reacciones diferentes a la de la *Salmonella*.

Al cumplir los agares con esta prueba se concluyó que son selectivos por lo tanto reúne una de las condiciones necesarias para su uso posterior.

Ver Tabla 4: Contraste de Reacción Bioquímica

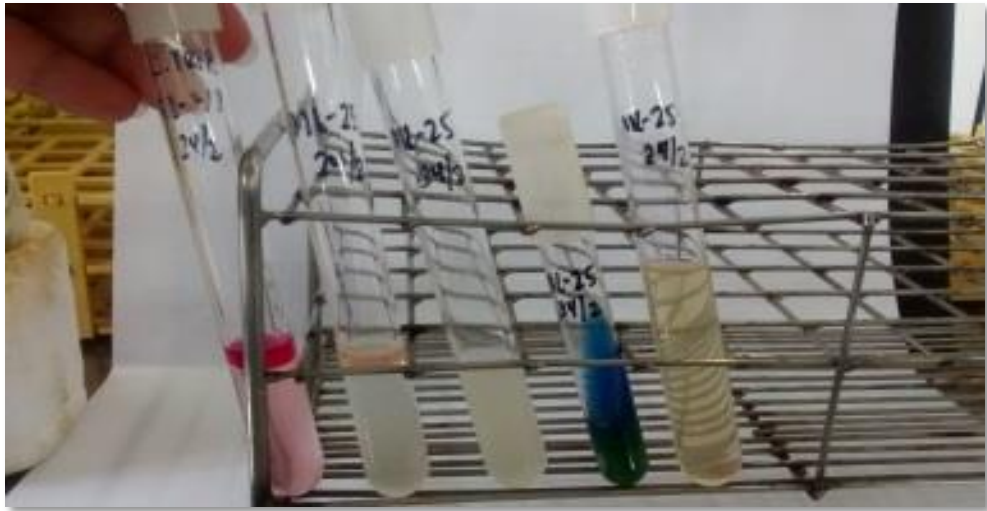


Figura 5: Pruebas bioquímicas de verificación de la cepa *Salmonella enterica*.  
(Control Positivo)



Figura 6: Pruebas bioquímicas de verificación de la cepa. *E. coli*. (Control Negativo).



### **6.1.3 PRUEBA DE VIABILIDAD DE LAS CEPAS**

Después de reactivar las cepas, *Salmonella enterica* y *E. coli* ssp, en el caldo no selectivo BHI a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ . se procedió a sembrar en medios de cultivo sólidos, Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), Rambash (RB) y Suldfito Bismuto (SB), para evaluar el crecimiento de los microorganismos y características correspondientes, estos medios se incubaron  $24\text{h} \pm 3\text{h}$  a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido ese tiempo se revisaron los agares.

Ver Tabla 5: Viabilidad de las cepas

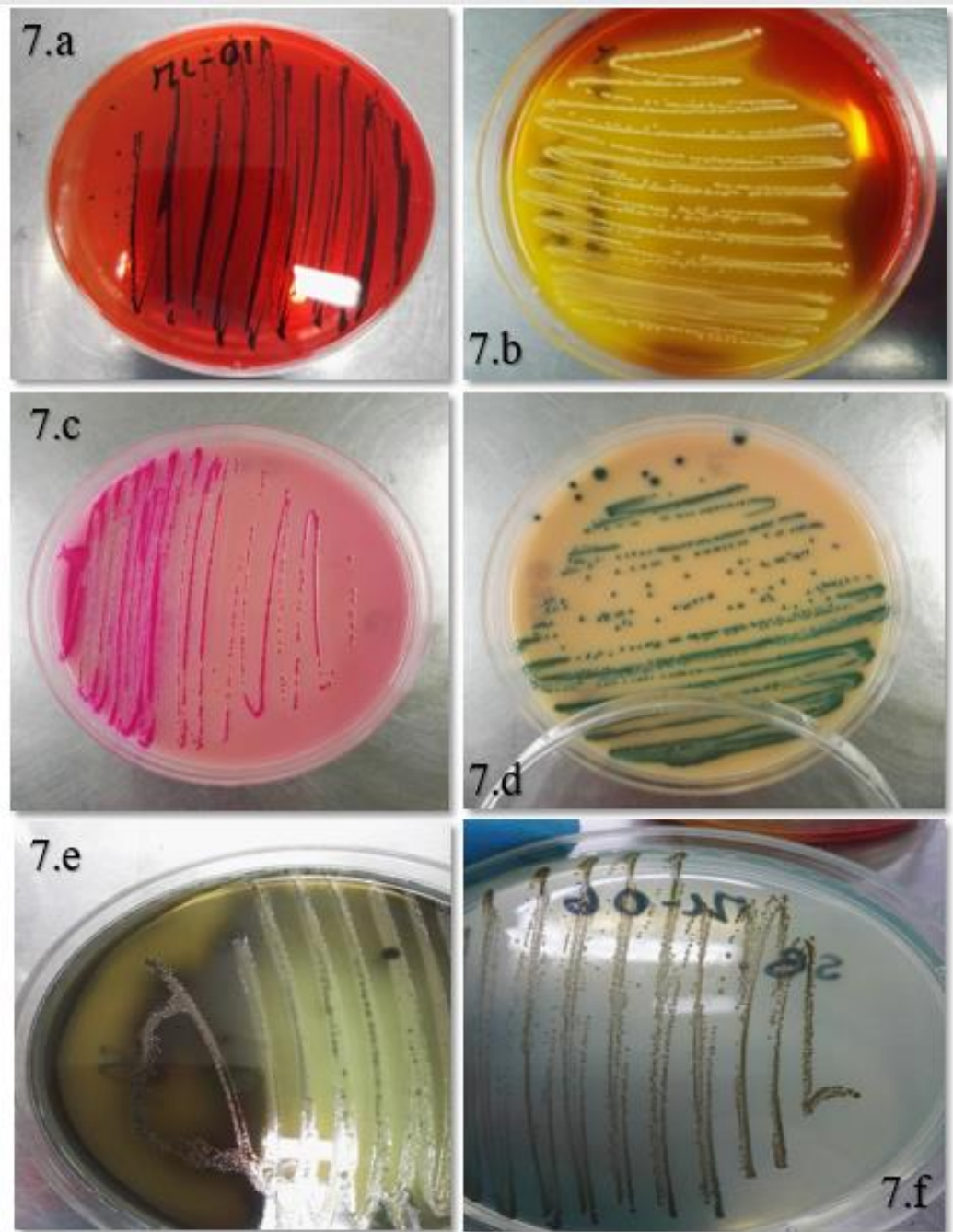


Figura 7: Prueba de viabilidad

- Figura 7a: Cepa *Salmonella enterica* en Agar XLD.  
Figura 7b: Cepa *E.coli* en Agar XLD.  
Figura 7c: Cepa *Salmonella enterica* en Agar Rambash.  
Figura 7d: Cepa *E.coli* en Agar Rambash.  
Figura 7e: Cepa *Salmonella enterica* en Agar SB.  
Figura 7f: Cepa *E.coli* en Agar SB.

## **6.2 CONTAMINACION ARTIFICIAL DE LA MUESTRA**

Se realizó un control de la matriz sólida, la cual fue sometida a proceso de esterilización para garantizar que estuviera libre de cualquier microorganismo, antes de proceder a inocular las muestras, se sometieron a ensayos tales como detección de microorganismos en agar Plate Count obteniendo como resultado ningún crecimiento en placa.

### **6.3 Pesaje y preparación de la muestra**

Después de tener el inóculo estandarizado de *Salmonella enterica* ( $10^{-6}$ ) y de *E. coli* ( $10^{-5}$ ) se realizó la preparación de ambos analitos y se procedió a inocular las 18 muestras de harina de pescado de manera aleatoria.

Después de tener listas las muestras contaminadas de forma artificial y las muestras no contaminadas, se inició el desarrollo de los protocolos para la detección de *Salmonella spp* tanto por el método microbiológico tradicional y el método alternativo propuesto MERs (Metodo de Ensayo Rapido - *Salmonella*).

Ver Tabla 6: Preparación de la concentración del inóculo

## **6.4 ANALISIS DE LAS MUESTRAS**

### **6.4.1 Fase de Pre-enriquecimiento.**

Se dispuso 25gr de harina de pescado y se agregó 225ml de Agua Peptona Tamponada (APT), obteniendo una dilución de 1/10; en esta fase se buscó que el APT reavivara las células pasadas o dañadas logrando de esta manera una condición fisiológica estable. Se dejó reposar la muestra durante 30 minutos y se incubó a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ .

### **6.4.2 Fase de enriquecimiento selectivo**

Se transfirió 0.1 ml del cultivo obtenido del APT. a un tubo con 10 ml de caldo Rappaport Vasiliaris y se incubó a  $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} \pm 3\text{h}$ . Se transfirió 1 ml del cultivo obtenido en APT. a un tubo con 10 ml de caldo Tetrionato de Kauffman y se incubó  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ .

La primera parte del proceso de análisis correspondiente al pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo y enriquecimiento selectivo, fue la fase común de las dos metodologías; cada método se realizó de forma individual hasta llegar a la fase de aislamiento e identificación que es donde varían los métodos.

### **6.4.3 Fase de Aislamiento e identificación**

Se tomó una asada de los cultivos obtenidos en. (caldo RVS y MKTTn) y se estiraron por separados en agar XLD, Rambash y Sulfito Bismuto. Se incubó a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} \pm 3$  (XLDy RB) y a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $48\text{ h} \pm 3$ . (SB). Se examinó las placas después del tiempo transcurrido de incubación y se determine la presencia de colonias típicas de Salmonella y colonias de morfología y coloración diferente que vendría a ser la flora acompañante inoculada.



Figura 8: Pase de Caldo a agares

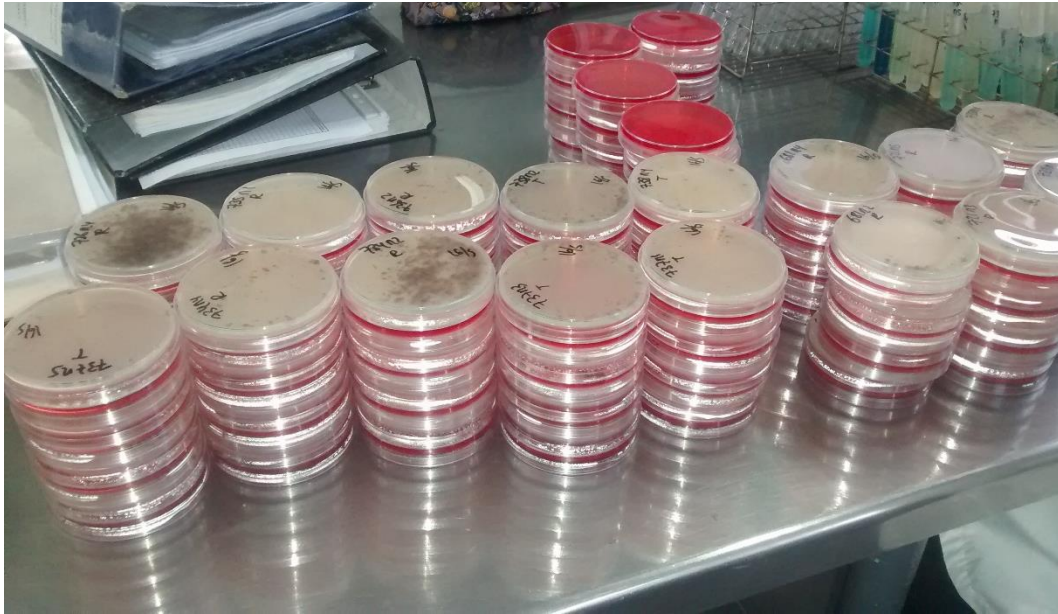


Figura 9: Fase de Aislamiento selectivo

#### **6.4.4 Fase de Bioquímica y serología.**

Las colonias que son presuntivas se aíslan en Agar Nutritivo semisólido para después de 24hr realizar la prueba de serología O,Vi y H y en la batería de bioquímica de comprobación.

Ver Tabla 6: Bioquímica confirmatoria.



Figura 10: Pase a batería de bioquímicas

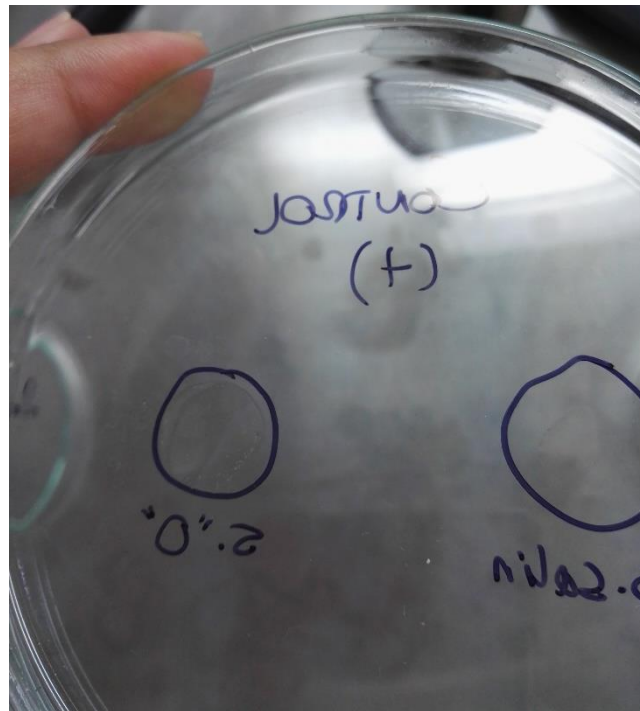


Figura 11: Pruebas serológicas

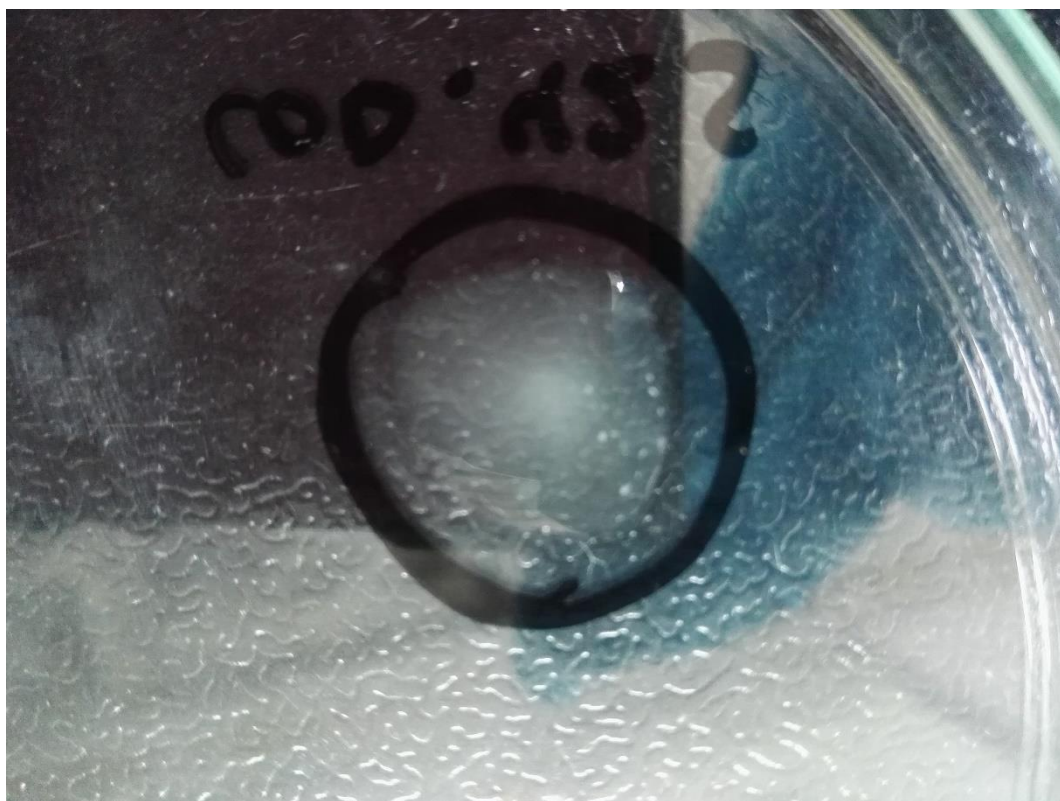


Figura 12: Aglutinación de *Salmonella enterica* en serología H.

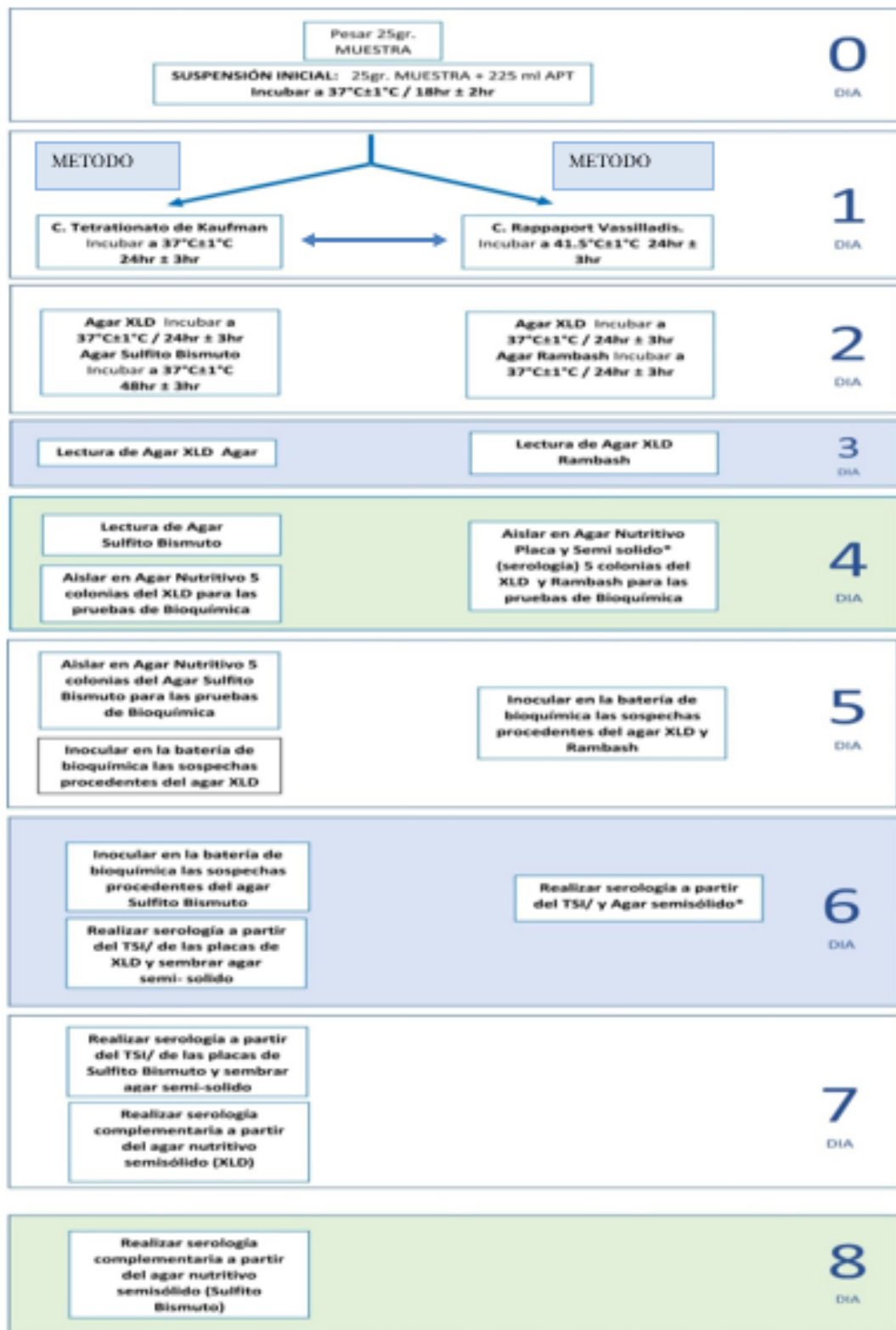


Figura 13: Flujograma de Método ISO vs Método MERs

## **VII. Resultados**

### **7.1 Aseguramiento de calidad**

#### **7.1.1 De los equipos:**

Las lecturas de los equipos evaluados antes y durante los ensayos se expresan en las Tablas 1,2,3; siendo estos óptimos para su uso y desarrollo durante todo el periodo de experimentación. Las temperaturas se encontraron dentro de los límites permitidos y alcances del método tanto para el método referente como para el método propuesto. Este monitoreo se llevó a cabo durante los 22 días que duro el ensayo a manera de evitar que en algún momento las condiciones de temperatura no salieran dentro de los límites establecidos.



Tabla 1: Verificación de Incubadora.

EQUIPO			INCBADORAS				BAÑO DE AGUA			
Termocupla			P-M.01/03		P-M.01/04		P-M.06/02		P-M.03/07	
Termopar			P-M.21/01		P-M.21/01		P-M.21/01		P-M.21/04	
Temperatura			P-M-22/03		P-M-22/04		P-M-22/05		P-M-22/20	
			37°C±1°C		35°C±1°C		41,5°C±1°C		41.5°C ± 0.5°C	
Fecha	Turnos	Puntos	Lect.	TCV	Lect.	TCV	Lect.	TCV	Lect.	TCV
dia 1	Mañana	pto3	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto4	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 2	Mañana	pto5	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto6	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 3	Mañana	pto7	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto8	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 4	Mañana	pto9	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto10	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 5	Mañana	pto1	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto2	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 6	Mañana	pto3	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto4	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 7	Mañana	pto5	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto6	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 8	Mañana	pto7	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto8	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 9	Mañana	pto9	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto10	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 10	Mañana	pto1	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto2	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 11	Mañana	pto3	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto4	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 12	Mañana	pto5	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto6	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 13	Mañana	pto7	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto8	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 14	Mañana	pto9	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto10	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 15	Mañana	pto1	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto2	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 16	Mañana	pto3	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto4	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 17	Mañana	pto5	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto6	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 18	Mañana	pto7	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto8	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 19	Mañana	pto9	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto10	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 20	Mañana	pto1	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto2	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 21	Mañana	pto3	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto4	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
dia 22	Mañana	pto5	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7
	Tarde	pto6	37	36.9	35	34.8	41.5	41.2	41.5	41.7

Tabla 2: Verificación de Balanzas

VERIFICACION DE BALANZA DIARIO							
Masa patrón (g)	5	Certif. calibración		PE17-C-0015	EMP ± (g)		0.05
Masa patrón (g)	50	Certif. calibración		PE17-C-0016	EMP ± (g)		0.1
Masa patrón (g)	200	Certif. calibración		PE17-C-0014	EMP ± (g)		0.3
Fecha	Masa	1a Verif.	2a Verif.	3a Verif.	Max-Min.	EMP	Conf.
Dia 1	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 2	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 3	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 4	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 5	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 6	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 7	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 8	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 9	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 10	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 11	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 12	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 13	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 14	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 15	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 16	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 17	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 18	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 19	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 20	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 21	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME
Dia 22	200	200	200	200	0	0.3	CONFORME
	5	5	5	5	0	0.05	CONFORME
	50	50	50	50	0	0.1	CONFORME

Tabla 3: Verificación de Potenciómetro.

CALIBRACIÓN DIARIA DEL pHmetro							
Fecha	Potencial asimetría (mV)	Aceptación potencial asimetría Límite aceptación (-15 a +25 mv)	Pendiente del electrodo (mV/pH)	Aceptación pendiente Límite aceptación (-56 a -60.5 mV/pH)	MARCA / LOTE		
					Buffers 4.0	Buffers 7.0	Buffers 10.0
Dia 1	20.1	OK	-56.9	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 2	20.2	OK	-56.5	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 3	11.3	OK	-57.8	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 4	16.2	OK	-56.8	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 5	3.1	OK	-57	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 6	4.6	OK	-56.6	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 7	4.6	OK	-56.3	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 8	4.1	OK	-56.1	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 9	4.6	OK	-56.1	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 10	11.3	OK	-57.1	OK	TR2	HC68498139	6689
Dia 11	4.6	OK	-56.3	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 12	11.3	OK	-57.1	OK	TR3	HC68498139	6689
Dia 13	4.6	OK	-56.3	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 14	4.6	OK	-57.3	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 15	4.2	OK	-58.2	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 16	4.6	OK	-56.3	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 17	4.1	OK	-56.1	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 18	4.6	OK	-56.1	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 19	11.3	OK	-57.1	OK	TR2	HC68498139	6689
Dia 20	4.6	OK	-56.3	OK	TR2	HC68498139	6688
Dia 21	11.3	OK	-57.1	OK	TR3	HC68498139	6689
Dia 22	4.6	OK	-56.3	OK	TR2	HC68498139	6688

### 7.1.2 De las cepas:

Para asegurar el buen comportamiento de las cepas estas fueron sometidas a ensayos que la norma internacional pide como un requerimiento; estos son comprobaciones mediante las bioquímicas correspondientes. De las cuales al someter a los caldos y agares que corresponden para cepas estas reaccionaron dentro de lo esperado según como se muestra en la data

Tabla 4: Contraste de Reacción Bioquímica

	CONTRASTE DE BIOQUIMICA					
	TSI Reac. K/A (A/A)c/s H <sub>2</sub> S	Urea (-)	M. descarboxilac ión L-lisinab (+)	M. Triptofano / triptona - Indol (-)	Medio V.P (-)	β- galactosidas a(-)
Salmonella	K/A	-	+	-	-	-
E. coli	K/K	-	0	+	-	+
Klebsiella aerogenes	K/A	+	0	-	+	-
Enterococcus faecalis	0	-	-	-	-	-

Las cepas tienen que tener una reacción opuesta al analito que se está buscando, en caso que una cepa no cumpliera con este requisito para dicho caldo o agar se buscara otra cepa con la reacción opuesta; tal es el caso de *Klebsiella* y *Salmonella* para la reacción de TSI ambas dan el mismo resultado y por ello se toma la cepa de *E. coli* para obtener la reacción opuesta; pero sin embargo para el caso del agar Urea salmonella indica una reacción negativa y *E.coli* y *Enterococcus* también pero *Klebsiella* es la cepa idónea para el contraste ya que esta muestra una reacción positiva. Casos similares ocurren para las pruebas de indol, VP y B galactosidasa.

La viabilidad se observa en el momento en que la cepa objetiva crece y se desarrolla en el medio selectivo expresándose con las características típicas de la cepa. La selectividad se observa cuando la cepa no objetiva expresa reacciones opuestas y estas características son muy evidentes como se explica en la tabla 4. Ambas cepas fueron enfrentadas en los mismos agares de tal manera que las características halladas nos sirvieran para identificar un presuntivo sin tener duda alguna en el momento de continuar con las fases confirmatorias.

### 7.1.3 Del medio de cultivo:

Para evaluar el medio se recurrió al ensayo de Productividad el cual busca que la tasa de recuperación de la cepa en el medio selectivo no seas <70% a comparación de un agar no selectivo. Esto define a la cepa como productiva para el ensayo.

Los resultados fueron óptimos ya que la tasa de recuperación fue mayor del 70%.

Tabla 5: Productividad del Agar.

Analito	Medio	Conteo 1	Conteo 2	Conteo 3	Conteo 4	Conteo 5	Promedio	PRODUCTIVIDAD
<i>Salmonella enterica</i>	PC	187	193	187	185	191	189	99.47
<i>Salmonella enterica</i>	XLD	186	191	187	184	190	188	
<i>Escherichia coli</i>	PC	243	238	239	239	241	240	97.58
<i>Escherichia coli</i>	XLD	236	229	236	229	241	234	

Analito	Medio	Conteo 1	Conteo 2	Conteo 3	Conteo 4	Conteo 5	Promedio	PRODUCTIVIDAD
<i>Salmonella enterica</i>	PC	192	189	193	191	191	191	99.27
<i>Salmonella enterica</i>	RAMBASH	192	190	187	191	189	190	
<i>Escherichia coli</i>	PC	251	248	237	246	249	246	93.50
<i>Escherichia coli</i>	RAMBASH	243	239	212	226	231	230	

Analito	Medio	Conteo 1	Conteo 2	Conteo 3	Conteo 4	Conteo 5	Promedio	PRODUCTIVIDAD
<i>Salmonella enterica</i>	PC	184	194	191	190	185	189	99.15
<i>Salmonella enterica</i>	SULFITO BISMUTO	191	185	184	189	187	187	
<i>Escherichia coli</i>	PC	236	238	241	237	241	239	98.66
<i>Escherichia coli</i>	SULFITO BISMUTO	242	232	242	232	229	235	

### 7.1.4 Del inóculo:

Para conocer la concentración inicial de las cepas en uso se recurrió al plaqueo por incorporación en un agar no selectivo pero que contara con las condiciones necesarias para la expresión del microorganismo en este caso se trabajó con Plate Count, obteniendo los siguientes conteos;

Tabla 6: Concentración del Inoculo

Analito	Medio	Concentracion						
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
<i>Salmonella enterica</i>	PC	>300	>300	>300	>300	183	20	1
<i>Escherichia coli</i>		>300	>300	>300	>300	236	31	4

Se encontró la concentración adecuada en las diluciones 10<sup>-6</sup> de tal manera que se pudiera realizar un conteo sesgado dentro de 300 colonias y poder definir cuál sería el inoculo a incorporar en las muestras que se contaminarían de manera artificial.

## 7.2 RESULTADOS DEL ENSAYO

El análisis estadístico se desarrolló en el programa MINITAB18 bajo los parámetros de cada variable a evaluar. Se realiza con los resultados obtenidos con los métodos a comparar tanto de las muestras inoculadas y muestras no inoculadas

Tabla 7: Muestras – Método Referencial ISO

<b>N° DE ENSAYOS</b>	<b>TIPO</b>	<b>MUESTRA (MATRIZ)</b>	<b>RESULTADO</b>
1	INOCULADA	HARINA PESCADO	POSITIVO
2		HARINA PESCADO	POSITIVO
3		HARINA PESCADO	POSITIVO
4		HARINA PESCADO	POSITIVO
5		HARINA PESCADO	POSITIVO
6		HARINA PESCADO	POSITIVO
7		HARINA PESCADO	POSITIVO
8	NO INOCULADA	HARINA PESCADO	NEGATIVO
9		HARINA PESCADO	NEGATIVO
10		HARINA PESCADO	NEGATIVO
11		HARINA PESCADO	NEGATIVO
12	INOCULADA	HARINA PESCADO	POSITIVO
13		HARINA PESCADO	POSITIVO
14	NO INOCULADA	HARINA PESCADO	NEGATIVO
15		HARINA PESCADO	NEGATIVO
16	INOCULADA	HARINA PESCADO	POSITIVO
17		HARINA PESCADO	POSITIVO
18	NO INOCULADA	HARINA PESCADO	NEGATIVO
19		HARINA PESCADO	NEGATIVO
20	INOCULADA	HARINA PESCADO	POSITIVO
21		HARINA PESCADO	POSITIVO
22	NO INOCULADA	HARINA PESCADO	NEGATIVO
23		HARINA PESCADO	NEGATIVO
24	INOCULADA	HARINA PESCADO	POSITIVO
25		HARINA PESCADO	POSITIVO
26	NO INOCULADA	HARINA PESCADO	NEGATIVO
27		HARINA PESCADO	NEGATIVO
28	INOCULADA	HARINA PESCADO	POSITIVO
29		HARINA PESCADO	POSITIVO
30		HARINA PESCADO	POSITIVO

Tabla 8: Muestras – Método a Validar MERs

N° DE ENSAYOS	TIPO	MUESTRA (MATRIZ)	RESULTADO
1	INOCULADA	HARINA PESCADO	POSITIVO
2		HARINA PESCADO	POSITIVO
3		HARINA PESCADO	POSITIVO
4		HARINA PESCADO	POSITIVO
5		HARINA PESCADO	POSITIVO
6		HARINA PESCADO	POSITIVO
7		HARINA PESCADO	POSITIVO
8	NO INOCULADA	HARINA PESCADO	NEGATIVO
9		HARINA PESCADO	NEGATIVO
10		HARINA PESCADO	NEGATIVO
11		HARINA PESCADO	NEGATIVO
12	INOCULADA	HARINA PESCADO	POSITIVO
13		HARINA PESCADO	POSITIVO
14	NO INOCULADA	HARINA PESCADO	NEGATIVO
15		HARINA PESCADO	NEGATIVO
16	INOCULADA	HARINA PESCADO	POSITIVO
17		HARINA PESCADO	POSITIVO
18	NO INOCULADA	HARINA PESCADO	NEGATIVO
19		HARINA PESCADO	NEGATIVO
20	INOCULADA	HARINA PESCADO	POSITIVO
21		HARINA PESCADO	POSITIVO
22	NO INOCULADA	HARINA PESCADO	NEGATIVO
23		HARINA PESCADO	NEGATIVO
24	INOCULADA	HARINA PESCADO	POSITIVO
25		HARINA PESCADO	POSITIVO
26	NO INOCULADA	HARINA PESCADO	NEGATIVO
27		HARINA PESCADO	NEGATIVO
28	INOCULADA	HARINA PESCADO	POSITIVO
29		HARINA PESCADO	POSITIVO
30		HARINA PESCADO	POSITIVO



Tabla 9: Esquema de tabla de contingencia

Estado de las muestras <sup>a</sup>	Resultados esperados (muestra)		Total
	Positivo (Inoculado)	Negativo (No inoculado)	
Positivo ( Detectado )	$N_{18}^c$	$N_0$	$N_{18}+N_0$
Negativo ( No detectado )	$N_0$	$N_{12}$	$N_0+N_{12}$
Total	$N_+ = N_{18}+N_0$	$N_- = N_0+ N_{12}$	$N_{30}$

*Categorización general de las muestras de prueba (Mc Clure, F.D., 1990)*

Donde:

La categorización es utilizada para definir falso negativo, falso positivo, especificidad y sensibilidad.

<sup>a</sup> El estado de la muestra es definido por el método, sea este el método de referencia o el método a validar

<sup>b</sup> El resultado esperado es definido como el resultado de los ensayos (confirmación de los resultados de ensayos positivos o negativos), según el uso para cálculos de sensibilidad y especificidad.

<sup>c</sup> N = número de resultados en alguna celda en particular. El primer número corresponde a la fila y el segundo a la columna.

## 7.2.1 TABLA DE CONTINGENCIA DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 10: Tabla de contingencia de resultados experimentales  
método referencial ISO

Resultado del método	Resultados esperados (muestra)		Total
	Positivo (Inoculado)	Negativo (No inoculado)	
Positivo ( Detectado )	18	0	18
Negativo (No detectado )	0	12	12
Total	18	12	30

Tabla 11: Tabla de contingencia de resultados experimentales  
método a validar MERs

Resultado del método	Resultados esperados (muestra)		Total
	Positivo (Inoculado)	Negativo (No inoculado)	
Positivo ( Detectado )	18	0	18
Negativo (No detectado )	0	12	12
Total	18	12	30

## 7.2.2 PARÁMETROS

### 7.2.2.1 SENSIBILIDAD RELATIVA

La sensibilidad será verificada con la proporción de verdaderos positivos (PVP) mediante la prueba binomial. Criterio de decisión: El método es sensible cuando se verifique que PVP sea 100%.

Tabla 12: Sensibilidad Relativa- Metodo Referencial vs MERs

MÉTODO DE REFERENCIA	Verdaderos positivos ( $N_{18}$ )	18
	Positivos esperados ( $N+$ )	18
SENSIBILIDAD (%)	Proporción de verdaderos positivos (PVP) = $N_{18} / N+$	100%

MÉTODO A VALIDAR MERs	Verdaderos positivos ( $N_{18}$ )	18
	Positivos esperados ( $N+$ )	18
SENSIBILIDAD (%)	Proporción de verdaderos positivos (PVP) = $N_{18} / N+$	100%

Ambos métodos reportan resultados con un 100% de sensibilidad relativa, por lo tanto, ambos métodos son sensibles.

### 7.2.2.2 ESPECIFICIDAD RELATIVA

La especificidad será verificada con la proporción de verdaderos negativos (PVN) mediante la prueba binomial.

Criterio de decisión: El método es específico cuando se verifique que PVN sea 100%.

Tabla 13: Especificidad Relativa- Método Referencial vs MERs

MÉTODO DE REFERENCIA	Verdaderos negativos ( $N_{12}$ )	12
	Negativos esperados ( $N_-$ )	12
ESPECIFICIDAD (%)	Proporción de verdaderos negativos (PVN) = $N_{12} / N_-$	100%

MÉTODO A VALIDAR	Verdaderos negativos ( $N_{12}$ )	12
	Negativos esperados ( $N_-$ )	12
ESPECIFICIDAD (%)	Proporción de verdaderos negativos (PVN) = $N_{12} / N_-$	100%

Ambos métodos reportan resultados con un 100% de especificidad relativa, por lo tanto, ambos métodos son específicos.

### 7.2.2.3 DESVIACIÓN NEGATIVA (FALSOS NEGATIVOS)

La desviación negativa será verificada con la proporción de falsos negativos (PFN) mediante la prueba binomial.

Criterio de decisión: La proporción de falsos negativos es 0%.

Tabla 14: Desviación Negativa (FN) - Método Referencial vs MERs

MÉTODO DE REFERENCIA	Desviación negativa ( $N_{18}$ )	0
	Positivos esperados ( $N_+$ )	18
DN (%)	Proporción de falsos negativos (PFN) = $N_{18} / N_+$	0%

MÉTODO A VALIDAR	Desviación negativa ( $N_{18}$ )	0
	Positivos esperados ( $N_+$ )	18
DN (%)	Proporción de falsos negativos (PFN) = $N_{18} / N_+$	0%

Ambos métodos presentan 0% de desviación negativa, por lo tanto, no reportan resultados falsos negativos.

#### 7.2.2.4 DESVIACIÓN POSITIVA (FALSOS POSITIVOS)

La desviación positiva será verificada con la proporción de falsos positivos (PFP) mediante la prueba binomial.

Criterio de decisión: La proporción de falsos positivos es 0%.

Tabla 15: Desviación Positiva - Método Referencial vs MERs

MÉTODO DE REFERENCIA	Desviación positiva ( $N_{12}$ )	0
	Negativos esperados ( $N_-$ )	12
DP (%)	Proporción de falsos positivos (PFP) = $N_{12} / N_-$	0%

MÉTODO A VALIDAR	Desviación positiva ( $N_{12}$ )	0
	Negativos esperados ( $N_-$ )	12
DP (%)	Proporción de falsos positivos (PFP) = $N_{12} / N_-$	0%

Ambos métodos presentan 0% de desviación positiva, por lo tanto, no reportan resultados falsos positivos.

#### 7.2.2.5 EXACTITUD RELATIVA

El método es exacto cuando es veraz, es decir, demuestra un alto grado de concordancia con los resultados esperados; y cuando es preciso, es decir, demuestra que los resultados esperados para las muestras inoculadas coinciden entre sí, en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, y lo mismo ocurre con los resultados esperados de las muestras no inoculadas.

Criterio de decisión: El método es exacto cuando se verifique que ER sea 100%

Tabla 16: Exactitud Relativa- Método Referencial vs MERs

MÉTODO DE REFERENCIA	Resultados concordantes a los valores esperados ( $N_{12} + N_{18}$ )	30
	Total de ensayos (N)	30
EXACTITUD (%)	Exactitud relativa (ER) = $(N_{12} + N_{18}) / N$	100%

MÉTODO A VALIDAR	Resultados concordantes a los valores esperados ( $N_{12} + N_{18}$ )	30
	Total de ensayos (N)	30
EXACTITUD (%)	Exactitud relativa (ER) = $(N_{12} + N_{18}) / N$	100%

Ambos métodos reportan resultados con un 100% de exactitud relativa, por lo tanto, ambos métodos son exactos.

## VIII. DISCUSIONES

*Salmonella spp.* es una de las principales causas de enfermedades gastrointestinales a nivel mundial. Debido a que su principal vía de transmisión es a través de los alimentos, especialmente de origen animal, la Unión Europea, Estados Unidos y otros países, han desarrollado diversas medidas para disminuir la presencia de éste y otros microorganismos, en animales destinados a la producción de alimentos de consumo humano (Martínez, 2010).

La dosis infectiva de *Salmonella spp.* está determinada en  $10^6$  UFC, sin embargo, esto depende de las características del individuo, los alimentos y la cepa involucrada, por lo que una dosis de entre una y diez células también pueden ser causante de salmonelosis (D'Aoust JY, 1997 citado por Martínez, 2011). Por tal motivo, la sola presencia de *Salmonella spp.* es considerada peligrosa para la salud humana.

A pesar que los métodos tradicionales de detección de microorganismos en alimentos son efectivos, tienen la desventaja de utilizar muchos recursos como el tiempo (al presentar un mayor número de etapas asociadas). Por este motivo, se siguen desarrollando metodologías alternativas. Los métodos alternativos tienen la característica de ser más rápidos, fáciles de utilizar y se pueden analizar en una menor unidad de tiempo. Los métodos inmunoenzimáticos, como los kit VIDAS®, detectan antígenos de los microorganismos en muestras de alimentos que han sido previamente enriquecidas (Biomérieux, 2013). Estos métodos constan de menos etapas y son sensibles y específicos que los métodos tradicionales sin embargo en el trabajo de Riquelme en el 2015 usa el método Vidas obteniendo resultados con una sensibilidad de 94.45% es decir que no podríamos trabajar con un aseguramiento de  $K=2$  por lo tanto los parámetros a usar

en un intercomparativo debe basarse en otros estadísticos; siendo la sensibilidad relativa de 99.01%

Si bien es considerado el método Vidas o el método MDS uno de los métodos rápidos para descarte de Salmonella, sin embargo, estos métodos detectan partículas o partes del ADN de la Salmonella y no células viables, por tanto, sería un ensayo presuntivo y no un ensayo de detección. Sin embargo, en las muestras analizadas en los tiempos estimados de este ensayo se detectaron la presencia de Salmonella en todas las muestras artificialmente inoculadas a fin de demostrar que este ensayo es eficiente y eficaz.



## IX. CONCLUSIONES

- El análisis para la detección de *Salmonella* spp, realizado por el método tradicional permite obtener resultados confiables pero es un proceso bastante largo y solo se obtienen resultados presuntivos 4 días después de que se inicia el proceso.
- El análisis para la detección de *Salmonella enterica* spp por el método propuesto, usando la primera parte del método tradicional ISO variando el agar selectivo cromogenico, permite obtener un resultado presuntivo o negativo, 4 días después de iniciado el proceso. Solo cuando se obtienen resultados presuntivos estos deben ser confirmados con pruebas serológicas y bioquímicas durante dos días adicionales.
- La prueba de identificación bioquímica permite detectar el género *Salmonella enterica* spp.
- La similitud entre los resultados obtenidos del análisis de la harina de pescado por el método tradicional y por el método propuesto (MERs), es la prueba de que si se pueden obtener resultados confiables por el método alternativo para el fin previsto.
- La sensibilidad calculada de acuerdo a los resultados obtenidos fue de 100%, es decir que el método MERs tiene una alta capacidad de detectar un alto número de muestras verdaderamente positivas.
- El valor de sensibilidad (100%) obtenido, es igual al que reporta anualmente la ISO como resultado del ensayo intercomparativo anual.
- La especificidad calculada fue de 100% es decir que el método MERs detecta exactamente el microorganismo de interés aun cuando hay otra flora acompañante en la muestra.

- Después de realizar todos los aseguramientos del método y aseguramiento de los resultados, los cuales son requisitos mandatorios en la norma ISO 17025; se comparan los resultados obtenidos por el método de referencia para las pruebas de detección de *Salmonella* spp con los resultados obtenidos por el método alternativo y teniendo en cuenta los resultados satisfactorios obtenidos de los parámetros analizados, se valida el método MERs para la detección de *Salmonella* spp en harina de pescado (materia prima usada para la elaboración de piensos para animales).

## X. RECOMENDACIONES

Para las pruebas de validación realizar no menos de 10 repeticiones; mientras mayor son las repeticiones la data arroja un valor certero de exactitud.

Para poder obtener mayor alcance se recomienda ampliar las variedades de matrices siguiendo la normativa de preparación de muestras; para ello considerar las temperaturas de incubación según la naturaleza de la matriz.

Para validar la robustez de método y obtener un valor referencial se recomienda inocular en concentraciones más sesgadas y en diferentes matrices. Considerar otra flora acompañante de interferencia para poder reconocer competencia del analito.

Es importante tener data referencial de incidencia por cuadro patológico de salmonelosis, es por ello que debemos considerar un banco de información de estas incidencias y trabajarlas junto al Instituto Nacional de la Salud y a su vez Organización Panamericana de la Salud.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta Castillo, L. E., & Ramírez Huayhuas, F. (2007). Desarrollo y validación prospectiva del método de análisis de valoración de gilmipiride 2 mg/rosiglitazona 4mg tabletas recubiertas por cromatografía líquida de alta performance. UNMSM – Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima- Peru 2007.
- A. E. A. S. (2012). Guía para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo de aguas Parte II. Criterios para la validación de los métodos de ensayos físico-químicos y microbiológicos de aguas. <http://www.aeas.es/documentos/guiafuncionamientolaboratoriosensayoagua>
- Andreoletti, O., Budka, H., Buncic, S., Colin, P., Collins, J. D., De, A., & Vanopdenbosch, E. (2008). Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *The EFSA J*, 720, 1-84.
- Aliverti, V. 2012. Desarrollo y validación intra-laboratorio de una metodología para la detección *Salmonella spp.* en carne bovina molida. Desarrollo de estrategias de prevención y control. Universidad Nacional de la Plata- Argentina.
- Andrews, W.; Jacobson, A.; Hammack, T. 2014. *Salmonella* In: Bacteriological Analytical Manual. Versión Febrero 2014. Food and Drug Administration (FDA). Washington, D.C., EEUU.
- Biomeriux. 2013. Manual de kit “VIDAS® *Salmonella*”, versión en español. Marcy l'Etoile, Francia. 1 p.
- Camaró-Sala, M. L., Martínez-García, R., Olmos-Martínez, P., Catalá-Cuenca, V., Ocete-Mochón, M. D., & Gimeno-Cardona, C. (2014).

Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica.

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC).; 2011. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011. [http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveillOverview\\_508.pdf](http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveillOverview_508.pdf) (accessed 1/07/2017)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC).; 2013. CDC National Outbreak Reporting System (NORS): <http://www.cdc.gov/outbreaknet/nors/>(accessed 1/07/2017).
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Salmonella Surveillance Annual Report, 2013. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2016.
- Estrada, J.; Valencia, B. 2012. Determinación de *Salmonella spp.* en huevos frescos de gallina en los principales mercados de la ciudad de Quito. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. Quito, Ecuador. Universidad Central del Ecuador. 4 p.
- Europeo, P. (2002). Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de Enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 1-24.
- FAO 2002, Inocuidad y comercio de la harina de pescado; Octava reunión Bremen, Alemania, 12-16 de febrero.
- Figueroa, M. (1984). Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centroamérica. EUNED.

- Flórez, R. (1981). Epizootiología de las Salmonelosis en bovinos, porcinos y aves. *Departamento de Bacteriología, INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES PECUARIAS México DF.*
- Fornés, D. (2008). Validación de métodos microbiológicos alternativos. In *Workshop MRAMA* (No. VII).
- Fornes, D. 2014. Metodología para validación interna de métodos de ensayo microbiológicos alternativos en alimentos. In: Validación de métodos microbiológicos. Santiago, Chile. 26-27 marzo 2014. Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria (ACHIPIA), Ministerio de Agricultura. pp. 3, 17-19.
- Gil-Setas, A., Mazón Ramos, A., Martín Salas, C., Urtiaga Domínguez, M., & Inza Elia, M. (2002). Salmonelosis no tifoidea en un área de salud de Navarra, España. *Revista española de salud pública*, 76(1), 49-56.
- International Commission on Microbiological Specifications of Foods, ICMSF 1975 Microorganismos de los alimentos 1: Su significado y métodos de enumeración. Editorial Acribia S.A. Segunda edición 1975 pag. 169-180.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO/IEC 17025. 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. INACAL Lima, Argentina. 32 p.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 6887-1. 2013. Microbiology of the food chain -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. Suiza. 8p
- Laso Sánchez, J. (2005) Situación de la validación de los ensayos microbiológicos en los laboratorios. Tercer Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios.

<http://www.gscsal.com/informacion-online/articulos-publicados.html:situacion-de-la-validacion-de-los-ensayos-microbiologicos-en-los-laboratorios-iberolab-2005>.

- Márquez, R. J. A. (2008). Salmonelosis: implicaciones en la salud pública y estrategias de control en sanidad animal. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, (21), 105-114.
- Organización Mundial de la Salud. OMS. 2013. Salmonelosis: Nota descriptiva N°139 Agosto de 2013 Food Safety Department OMS/Ginebra.
- Organización Mundial de la Salud. OMS. 1988. Control de Salmonelosis: importancia de la higiene veterinaria y de los productos de origen animal. Ginebra. Serie de informes técnicos 774.
- Ortega González, M., Rodríguez Martínez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Cualitativos. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 162-176.
- PARRA, M. A. O., & SALAZAR, D. M. R. (2007) Diseño y elaboración de una guía preliminar para la validación de métodos microbiológicos estándar. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis108.pdf>
- Paucar, L. 2014 Control de calidad de harina de pescado. Universidad del Santa – Chimbote – Perú 2014.
- Riquelme, V.; 2015.; Verificación de un método alternativo para la detección de *Salmonella* spp. en matrices de alimentos. Universidad de Chile, SANTIAGO, CHILE

- Schlicht, Stange, A. 1997. Comparación de dos técnicas de diagnósticos de Salmonella spp. en harina de pescado, Universidad Austral de Chile. Valdivia Chile.



## XII. ANEXOS

- a. Ficha de seguridad Agar RAMBASH
- b. Pruebas de especificidad del Agar Rambash
- c. Fundamento del agar Rambash.

Alain fundamenta este agar de recuperación para *Salmonella* spp. En función al componente principal el cual es el Propilenglicol junto al indicador 13-Galactosidasa ayuda a diferenciar *Salmonella* de *Proteus* spp y demás miembros de los Enterobacereaceae; también usa el Desoxicolato como inhibidor de otros microorganismos.

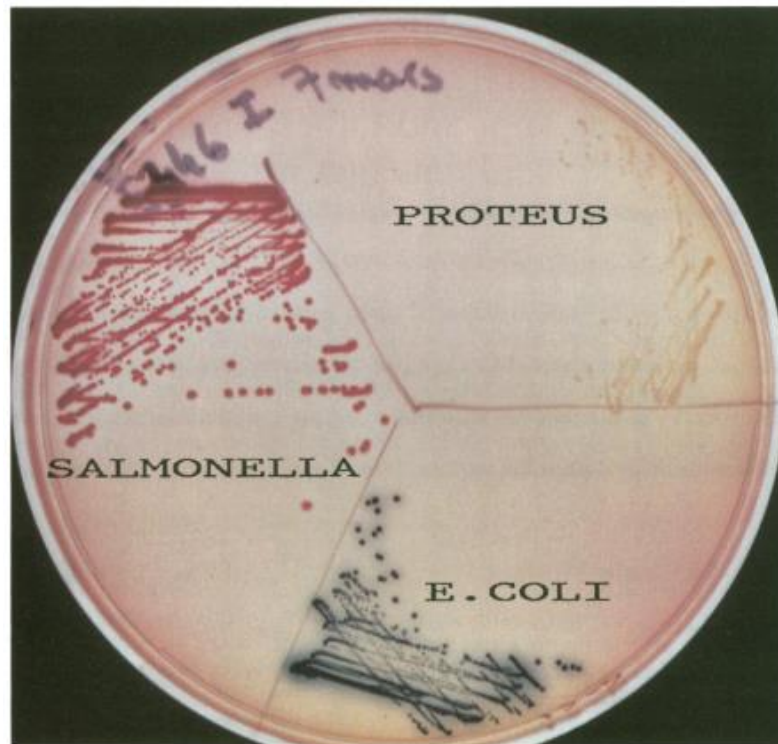


Figura 14: Comparación de tres cepas diferentes en agar RAMBASH (Rambash A. - 1990)

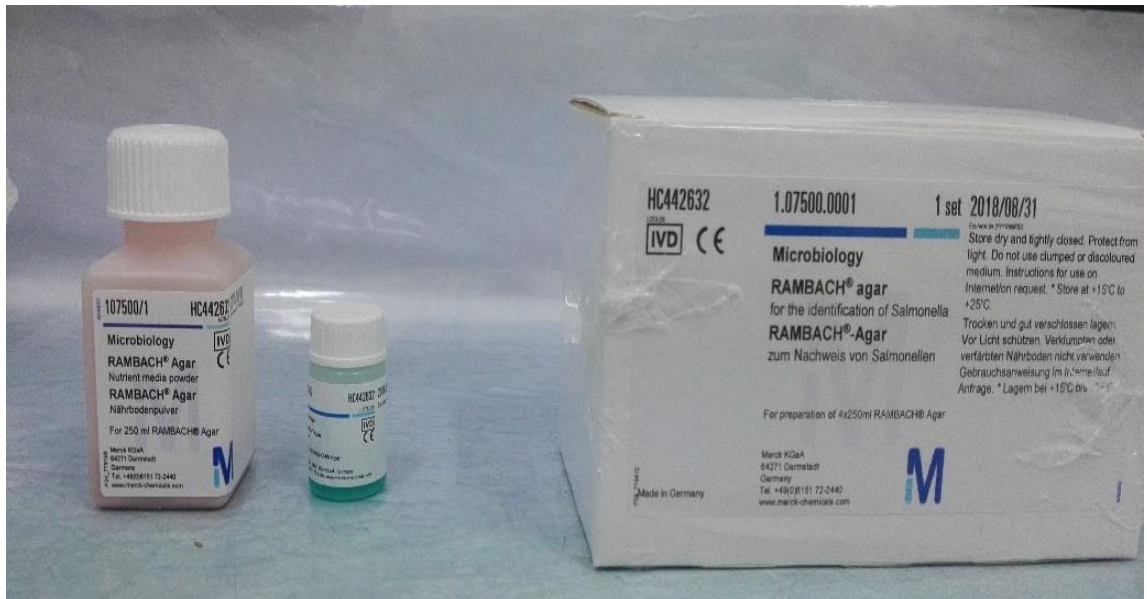


Figura 15: Kit Agar RAMBASH (Presentación comercial)