

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS**

**COMPARACIÓN DE MÉTODOS RÁPIDOS (SCREENING) ASSURANCE GDS SYSTEM Y DE INMUNOENSAYO VIA TECRA CONTRA EL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella spp.* (ISO 6579:2002, IDT) EN CARNE DE POLLO FRESCA, PROVENIENTES DE SUPERMERCADOS DEL ÁREA METROPOLITANA DE SAN SALVADOR.**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRA EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS**

**PRESENTADO POR:**

**LICDA. CLAUDIA LISSETTE ALBERTI ARROYO**

**LICDA. JESSICA TATIANA BURGOS SIERRA**

**FEBRERO DE 2017**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMÉRICA**

**RECTOR**

**MASTER ROGER ARMANDO ARIAS**

**SECRETARIA GENERAL**

**DOCTORA ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA**

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANO**

**LICENCIADO SALVADOR CASTILLO AREVALO**

**SECRETARIO**

**MAESTRO ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO**

## HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE GRADUACION

**Comparación de Métodos rápidos (screening) Assurance GDS System y de inmunoensayo VIA TECRA contra el método horizontal para la detección de *Salmonella spp.* (ISO 6579:2002, IDT) en carne de pollo fresca, provenientes de supermercados del área metropolitana de San Salvador.**

### COMITÉ DE TESIS

Lic. Coralia de los Angeles González MsC

---

#### Docente Asesor

Dr. Javier Castro Rosas

---

#### Docente Asesor

Lic. María Evelyn Sánchez de Ramos MsC

---

#### Tribunal evaluador

Lic. Ana Delmy Hércules de Melara MsC

---

#### Tribunal evaluador

Lic. Coralia de los Angeles González MsC

---

#### Coordinadora Maestría

Lic. Edith Alicia Torres de Cantón MsC

---

#### Coordinadora Posgrado

#### Estudiantes

---

Lic. Claudia Lissette Alberti Arroyo  
Lic. Jessica Tatiana Burgos Sierra

Fecha de entrega: febrero de 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

A Nuestro Creador, por el don maravilloso de la vida, por iluminarnos en cada una de las etapas de nuestro desarrollo, poniendo así de manifiesto su presencia. Por darnos la fortaleza necesaria en los momentos más difíciles, y sobre todo por ser un Padre amoroso para con nosotras.

A la Virgen María, madre nuestra, por estar siempre velando por nuestras necesidades, y acompañándonos en nuestro caminar.

A nuestros padres y hermanos, por ser nuestras principales fuentes de inspiración, y por impulsarnos siempre a salir adelante, esperamos que se sientan orgullosos.

Al comité de Trabajo de Graduación: Coordinadora de Post grado, Lic. Edith Alicia Torres de Cantón MsC; Tribunal Evaluador, Lic. María Evelyn Sánchez de Ramos MsC, Lic. Ana Delmy de Melara MsC, Docentes Directores, Lic. Coralia de los Angeles González MsC y Dr. Javier Castro Rosas, por enriquecer el presente trabajo, a través del apoyo recibido a lo largo del mismo.

A nuestros docentes, por darnos importantes herramientas mediante los conocimientos impartidos durante la maestría.

Al Instituto Nacional de Salud a través del Laboratorio Nacional de Referencia, por su completa colaboración en el presente estudio.

A nuestros compañeros y amigos, por apoyarnos en todo este proceso.

Clau y Taty

## **DEDICATORIA**

Dedico este nuevo logro, especialmente a la Santísima Trinidad, que con su caridad infinita pone de manifiesto en cada instante de mi vida lo maravilloso que es hacer realizables los sueños. Por su gran Providencia, que jamás me desamparó y me mantuvo firme ante dificultades y pruebas. A nuestra madre la Virgen María, por siempre escuchar mis súplicas, e interceder por mí.

A mis amados padres, José y Noemí, por demostrarme su amor radical a través del inmenso sacrificio realizado para sacarnos adelante, por forjar en mí, carácter y valores, por corregirme y orientarme en cada etapa de mi vida pese a la adversidad. Dios fue inmensamente bueno, al darme unos padres como ustedes.

A mi persona favorita Rey Ponce, por toda la paciencia, franqueza, apoyo, colaboración, y sobre todo, amor, que me ha demostrado sin medida. Gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, impulsarme a cumplir mis metas y por ser mi esposo, que es la mejor parte.

A mis hermanos y hermanas por ayudarme a descubrir que una familia es un don maravilloso de Dios, y que pese a las dificultades, estaremos unidos.

A mis sobrinos, que me llenan de sonrisas, cosquillas, abrazos y besos, y que cambian cualquier cansancio en felicidad.

A mis compañeros y amigos, por estar siempre en el momento oportuno, por compartir experiencias y aventuras, y mostrar siempre lo espléndida que es la vida.

A mi compañera de tesis Tatiana Burgos, por soportarme a mí y mis circunstancias, por ser una fuente inagotable de sonrisas, y ser más que una compañera, una cómplice y una amiga. Lo logramos Taty!

Claudia Alberti

## **DEDICATORIA**

A Dios, a la Virgen María, por darme la oportunidad de alcanzar este nuevo logro, porque con su bondad infinita me han fortalecido y no han permitido dejarme desfallecer ante las dificultades de la vida.

A mi mami Lidita y abuelito Naldo, porque con su amor, compañía, apoyo incondicional, sus enseñanzas y sus correcciones, han sido uno de los pilares más importantes para llegar al cumplimiento de mis metas, le agradezco a Dios por darme dos angelitos de la guarda de abuelitos.

A mi papi Edgar y mi mami Elizabeth, mil gracias por estar conmigo en este caminar de la vida, por su apoyo, su amor, sus consejos, por instarme a no decaer en mis esfuerzos por culminar la tesis y gracias a Dios por brindármelos como padres.

A mi hermano René, por su compañía, su apoyo al escuchar todas mis tareas pendientes con la tesis, por ser mi hermano y estar conmigo en las buenas y las malas. A mi Ale, gracias por la paciencia de acompañarme en todo momento.

A mis queridos Totti, Pippo y Lunita, porque con sus demostraciones de cariño sincero, me alegran el día y me motivan a seguir adelante.

A toda mi familia, a mis amigas y amigos, por estar siempre pendientes de mí, brindarme su confianza y palabras de ánimo.

A Claudia Alberti, mi compañera de tesis, mil gracias por impulsarme a seguir adelante, a culminar este nuevo propósito trazado algunos años atrás, pero sobre todo por ser mi amiga, brindarme su cariño, sus consejos y su apoyo en cada momento en que lo he necesitado. ¡Lo hemos logrado Claudinha!

Tatiana Burgos

## INDICE GENERAL

	<b>Páginas</b>
Abreviaturas	
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xx
Capítulo II	
2.0 Objetivos	23
Capítulo III	
3.0 Marco teórico	25
3.1 Generalidades	25
3.1.1 Taxonomía del Género <i>Salmonella</i>	25
3.1.2 Estructura antigénica	26
3.2 Epidemiología de Salmonelosis no tifoideas	26
3.3 Fuentes de <i>Salmonella</i>	27
3.4 <i>Salmonella</i> en pollo	27
3.5 Infección y patogénesis de <i>Salmonella</i>	28
3.6 Métodos de detección de <i>Salmonella spp.</i> en alimentos	30
3.6.1 Método Convencional	30
3.6.1.1 Enriquecimiento no selectivo o preenriquecimiento	30
3.6.1.2 Enriquecimiento selectivo	31
3.6.1.3 Aislamiento en medios sólidos, selectivos y diferenciales	31
3.6.1.4 Confirmación Bioquímica y Serológica	32

3.6.1.4.1	Identificación Bioquímica	33
3.6.1.4.2	Diagnóstico Presuntivo de <i>Salmonella</i>	33
3.6.1.4.3	Serotipificación de <i>Salmonella</i>	34
3.6.2	Métodos alternativos	37
3.6.2.1	Métodos basados en técnicas inmunológicas	38
3.6.2.2	Métodos moleculares	39
3.6.3	Aplicación de técnicas moleculares en la detección e identificación de patógenos transmitidos por alimentos.	41
3.6.3.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
3.6.3.1.1	Etapas de la PCR	42
3.6.3.1.2	Sistema de detección genética GDS Assurance	43
3.6.3.1.3	Ventajas de las técnicas moleculares	44
3.6.3.1.4	Limitaciones de las técnicas moleculares	45
3.7	Verificación de métodos alternativos	46
3.7.1	Proceso de verificación de un método alternativo	47
3.7.1.1	Sensibilidad	48
3.7.1.2	Especificidad	48
3.7.1.3	Tasa de falsos positivos	48
3.7.1.4	Tasa de falsos negativos	48
3.8	Resultados discordantes	49
3.9	Diferencias significativas entre métodos	49



## Capítulo IV

4.0	Metodología	52
4.1	Metodología del estudio	52
4.2	Universo y muestra	52
4.2.1	Universo	52
4.2.2	Muestra	52
4.2.2.1	Tamaño de muestra	52
4.2.2.2	Puntos de muestreo	53
4.3	Metodología analítica	55
4.3.1	Método convencional	55
4.3.1.1	Procedimiento	55
4.3.1.2	Confirmación bioquímica	56
4.3.1.3	Control de calidad	58
4.3.2	Técnica de Biología molecular	58
4.3.2.1	Preparación de la muestra y pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo	59
4.3.2.2	Realización del método mediante Assurance GDS <i>Salmonella</i>	59
4.3.2.3	Resultados e interpretación	62
4.3.2.4	Confirmación de los resultados presuntivos positivos.	62
4.3.2.5	Control de calidad	63
4.3.3	Inmunoensayo enzimático	63
4.3.3.1	Preparación de la muestra y pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo	63

4.3.3.2	Enriquecimiento en medio liquido selectivo.	64
4.3.3.3	Post- enriquecimiento	64
4.3.3.4	Desarrollo del inmunoensayo.	64
4.3.3.5	Interpretación de resultados	66
4.3.3.6	Confirmación de los resultados presuntivos positivos	66
4.3.3.7	Control de calidad	66
4.4	Preparación de controles de calidad	67
4.4.1	Preparación de control positivo.	67
4.4.2	Preparación de control negativo	67
4.5	Método de procesamiento de datos y análisis	68
4.5.1	Caracterización de parámetros de estudio	68
4.5.2	Análisis de datos discrepantes	69
4.5.3	Diferencias significativas mediante Chi cuadrado McNemar	70
Capítulo V		
5.0	Resultados y discusión de resultados	72
5.1	Resultados obtenidos por el Método convencional o de referencia	72
5.2	Resultados obtenidos por el método Assurance GDS System	77
5.3	Resultados obtenidos por el método de inmunoensayo VIA TECRA	83
5.4	Comparación de los métodos en estudio	88
5.4.1	Muestras presuntivas contra muestras confirmadas	94
5.4.2	Cálculo de Exactitud Relativa	95

5.4.3	Cálculo de la Sensibilidad	97
5.4.4	Cálculo de Especificidad	100
5.4.5	Cálculo de Tasa de Falsos Positivos	101
5.4.6	Cálculo de Tasa de Falsos Negativos	104
5.4.7	Análisis de datos discordantes	105
5.4.7.1	Comprobación de los métodos, al evaluar si son comparables a su referencia, respecto a Sensibilidad y Especificidad.	105
5.4.8	Chi cuadrado de McNemar	107
5.4.8.1	Evaluación de Assurance GDS	107
5.4.8.2	Evaluación de VIA TECRA	108
5.4.9	Evaluación General del método Assurance GDS System	108
5.4.10	Evaluación General del método VIA TECRA	110
Capítulo VI		
6.0	Conclusiones	112
Capítulo VII		
7.0	Recomendaciones	115
	Bibliografía	
	Glosario	
	Anexos	

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura No.</b>		<b>Página</b>
1	Imagen de <i>Salmonella</i> en 3D generada por computadora	25
2	Algunas proteínas efectoras involucradas en los rearrreglos del citoesqueleto	29
3	Sistemas de secreción bacteriana	29
4	Etapas de técnica PCR	41
5	Comportamiento de las muestras mediante método convencional.	75
6	Comportamiento de las muestras mediante el método Assurance	81
7	Comportamiento de las muestras mediante el método VIA TECRA	87
8	Muestras presuntivas versus muestras confirmadas por los métodos evaluados.	94
9	Exactitud Relativa de los métodos evaluados	96
10	Sensibilidad de los métodos evaluados.	98
11	Especificidad de los métodos evaluados.	101
12	Tasa de Falsos Positivos de los métodos evaluados	102
13	Tasa de Falsos Negativos de los métodos evaluados.	104

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla No.</b>		<b>Página</b>
1	Tiempos de análisis requeridos en métodos convencionales y métodos alternativos.	37
2	Ejemplos de kits PCR en tiempo real disponibles para bacterias patógenas transmitidas por alimentos.	43
3	Muestras tomadas según establecimiento.	54
4	Interpretación de resultados del Rotor Gene.	62
5	Resultados apareados de la referencia y el método alternativo.	68
6	Valores de M para Y discrepancias.	70
7	Resultados obtenidos mediante el método convencional.	73
8	Resumen de resultados obtenidos mediante el método convencional.	75
9	Resultados obtenidos mediante el método Assurance GDS System.	77
10	Resumen de resultados presuntivos obtenidos mediante el método Assurance GDS System.	81
11	Resultados obtenidos por método VIA TECRA	83
12	Resumen de resultados presuntivos obtenidos por el método VIA TECRA.	87
13	Resultados generales de la comparación de los métodos.	91
14	Recuento de elementos destacados en la comparación de métodos.	93
15	Resumen de resultados presuntivos versus resultados confirmados.	94

16	Exactitud Relativa de los métodos.	96
17	Sensibilidad de los métodos.	97
18	Especificidad de los métodos.	100
19	Tasa de falsos positivos.	102
20	Tasa de falsos negativos.	103
21	Resumen de datos discordantes.	105
22	Resumen de parámetros de desempeño evaluados en Assurance GDS System.	109
23	Resumen de parámetros de desempeño evaluados en el método VIA TECRA.	110

## INDICE DE ANEXOS

### Anexo No.

1. Mapa de ubicación de los puntos de muestreo.
2. Listado general de material, equipo y medios de cultivo.
3. Esquema de detección, aislamiento e identificación de *Salmonella spp.* en muestras de Alimentos.
4. Esquema del método Assurance GDS System.
5. Esquema del Inmunoensayo colorimétrico de enzima policlonal *Salmonella*.
6. Color Card 2 (Carta de color) para interpretación de resultados.
7. Esquema de preparación de los controles positivos y negativos.
8. Crecimiento característico de *Salmonella spp* en Agares Selectivos.
9. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella spp*, LIA, TSI y Urea típicas.
10. Ejemplo de prueba bioquímica miniaturizadas utilizadas API 20E, positiva para *Salmonella spp*.
11. Ejemplo de lectura emitida por software API WEB, positiva para *Salmonella spp*.
12. Resultado de inmunoensayo VIA Tecra *Salmonella*
13. Resultados emitidos por GDS correspondientes a corrida 1-6.
14. Ejemplo de hoja de trabajo correspondiente a inmunoensayo VIA TECRA.
15. Ejemplo de hoja de datos crudos utilizada.
16. Fórmulas generadas en Excel para asignación de parámetros.
17. Ejemplos de cálculos realizados para determinar valor de parámetros evaluados.
18. Procedimiento Assurance GDS System muestras diversas.
19. Identificación bioquímica de enterobacterias por el sistema API 20E

## ABREVIATURAS

**ISO:** International Organization of Standardization

**VIA:** Visual Immunoassay

**GDS:** Genetic Detection System

**ATCC:** American Type Culture Collection

***spp:*** subespecie

**ADN:** Acidodesoxirribonucleico

**ADNr:** Acido desoxirribonucleico ribosomal

**°C:** Grados Celsius

**TSI:** Agar triple hierro azúcar

**LIA:** Agar hierro lisina

**TSA:** Agar tripticasa soya

**AOAC:** Association of Official Analytical Chemists



## RESUMEN

Los avances en la ciencia y la tecnología han proporcionado una multiplicidad de herramientas para la detección de patógenos de interés para la salud pública, tanto en muestras humanas a nivel clínico como en los alimentos y agua de consumo. Uno de los patógenos que posee mayor incidencia en brotes a nivel mundial y cuyo control es uno de las principales preocupaciones en salud pública es *Salmonella*, una enterobacteria, cuya detección por métodos convencionales de cultivo, conlleva una espera de 4 días para liberar una muestra como negativa o considerarla como presuntiva positiva, y de 8 a 9 días para poder confirmar su presencia en un determinado alimento. Razón por la cual, utilizar nuevas metodologías que garanticen resultados confiables en tiempos más cortos, es una búsqueda constante.

Este trabajo se fundamentó en la necesidad de comparar el desempeño de dos métodos alternativos para la detección de *Salmonella*: Assurance GDS System, que es parte de la gama de los métodos moleculares, y el inmunoensayo VIA TECRA, que es una prueba de ELISA, contra lo descrito en el método horizontal para la detección de *Salmonella* ISO 6579:2002, IDT, el cual es un método de cultivo convencional considerado de referencia.

La matriz utilizada para dichos ensayos fue carne fresca de pollo, proveniente de supermercados del área metropolitana de San Salvador, dado que en dicha extensión geográfica se ha notado una alza importante en los casos de salmonelosis <sup>(29)</sup> y la carne de pollo fresca constituye uno de los productos mayormente adquiridos por los consumidores, y que se ha visto familiarizada como reservorio de dicho patógeno, por sus características como actividad de agua, pH.

Para determinar el tamaño de muestra se utilizó un criterio derivado de la fórmula de Cochram que se deduce como un factor de corrección, obteniéndose un numero muestral de 72 pero dadas las posibilidades en cuanto a materiales e insumos el estudio se desarrolló con 96 muestras. Dichas muestras fueron

adquiridas de 3 cadenas de supermercados (12 establecimientos) de cada uno se obtuvieron 8 muestras, 4 correspondientes a muslos y 4 a pechugas. Las muestras se transportaron en bolsas estériles separadas e identificadas entre sí, manteniendo una temperatura menor a 4°C. Cada corrida de análisis estuvo constituida por 16 muestras, que se analizaron en simultáneo por los 3 métodos. Como control positivo se utilizó *Salmonella* ATCC 14028 y como control negativo *Escherichia coli* ATCC 25922. Se incluyeron controles de esterilidad del lote de bolsas utilizadas y de los medios de cultivo correspondientes. Dicho trabajo analítico se desarrolló durante los meses de septiembre y octubre de 2016.

Los cálculos respectivos de los parámetros en estudio (Exactitud Relativa, Sensibilidad, Especificidad, Tasa de Falsos Positivos, Tasa de Falsos Negativos y Chi cuadrado) se realizaron utilizando Microsoft Excel 2010.

Con el método alternativo inmunoensayo VIA TECRA se obtuvo 88% de Sensibilidad, 86% de Especificidad, 14% de Tasa de Falsos Positivos y 12% de Tasa de Falsos Negativos, mientras que el Assurance GDS System alcanzó un 85% de Sensibilidad, un 81% de Especificidad, 19% de Tasa de Falsos Positivos y un 15% de Tasa de Falsos Negativos. Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los métodos evaluados ( $P \leq 0.05$ ), aplicable específicamente a la matriz ensayada.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCION

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) abarcan un amplio espectro de padecimientos y constituyen un problema de Salud Pública creciente en todo el mundo <sup>(22)</sup> Más de 250 enfermedades conocidas se transmiten a través de alimentos. Su incidencia ha aumentado considerablemente durante las últimas décadas debido a la rápida globalización del mercado de alimentos <sup>(24)</sup>. Una de las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes y ampliamente extendidas es, la salmonelosis, causada por la bacteria *Salmonella*. Se estima que afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones <sup>(23)</sup> Según la Unión Europea (UE), una de las fuentes principales de salmonelosis humana son los productos avícolas crudos <sup>(9)</sup>

Para el presente estudio se evaluó la carne fresca de pollo, que puede contener *Salmonella*, la cual si no recibe la cocción necesaria, el patógeno puede sobrevivir en el producto y al ser consumido podría causar una ETA.

La detección y la investigación de los brotes de ETA constituye uno de los principales retos para el Sistema de Salud Pública, pues requiere obtener de manera oportuna y eficaz información médica (datos personales, síntomas, entre otro.) y resultados de análisis de laboratorio de los alimentos implicados o de las materias primas empleadas en su elaboración <sup>(19)</sup>

Es deseable que los métodos para la detección de *Salmonella* posean la sensibilidad suficiente para detectar una célula del microorganismo en una muestra definida <sup>(19)</sup> Los métodos convencionales conllevan de 4 a 9 días para la detección y la identificación de *Salmonella*. Actualmente, se han desarrollado varios procedimientos rápidos y alternativos para la tipificación y la identificación de bacterias, proporcionando respuestas más rápidas y oportunas <sup>(33)</sup>. Con esta investigación se logró comparar, según los parámetros establecidos en el estándar ISO 16140:2003, el método horizontal para la detección de

*Salmonella* (ISO 6579:2002, IDT) en carne fresca de pollo, contra dos métodos rápidos, el primero es el Assurance GDS *Salmonella* que combina un paso de separación inmunomagnética (IMS) con un ensayo de detección de Reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real, y el segundo método, es un ELISA rápido para discriminación de *Salmonella* en muestras de alimentos.

Esta investigación se desarrolló dentro de las instalaciones del Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Toxicología del Ministerio de Salud en el período de septiembre a octubre de 2016.

**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS**

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Comparar los Métodos rápidos (screening) Assurance GDS System y de inmunoensayo VIA TECRA contra el método horizontal para la detección de *Salmonella spp.* (ISO 6579:2002, IDT) en carne de pollo fresca provenientes de supermercados del área metropolitana de San Salvador.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Identificar la presencia de *Salmonella* en carne fresca de pollo por el método horizontal para la detección de *Salmonella* (ISO 6579:2002, IDT).

2.2.2 Detectar la presencia de *Salmonella* en carne fresca de pollo por el método rápido (screening) Assurance GDS System.

2.2.3 Determinar la presencia de *Salmonella* en carne fresca de pollo por el método rápido de inmunoensayo (screening) VIA TECRA para *Salmonella*.

2.2.4 Evaluar según los parámetros establecidos en el estándar ISO 16140:2003 (Exactitud Relativa, Especificidad, Sensibilidad, Tasa de falsos positivos, Tasa de falsos negativos) la eficacia de los métodos alternativos y el método convencional para la detección de *Salmonella* en carne fresca de pollo.

2.2.5 Analizar si existe diferencia significativa entre los métodos alternativos y el método convencional para la detección de *Salmonella* en carne fresca de pollo.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**



### 3.0 MARCO TEORICO

#### 3.1 Generalidades

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo gram-negativo, no formador de esporas, que puede fermentar la glucosa, pero casi nunca fermentan la sacarosa o lactosa.<sup>(21)</sup> La mayoría de Las salmonelas son resistentes a ciertas sustancias químicas por ejemplo, verde brillante, tetracionato de sodio, desoxicolato de sodio, etc., que inhiben otras bacterias entéricas; por ello, es útil incluir estos compuestos en los medios de cultivo para aislar dicho patógeno. <sup>(29)</sup>



**Figura No.1.** Imagen de *Salmonella* en 3D generada por computadora.

(Fuente:News releases, CDC.)

#### 3.1.1 Taxonomía del Género *Salmonella*.

El género *Salmonella* posee un aproximado de 2700 serovariedades, se divide en dos especies, que pueden causar enfermedad al humano: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*.<sup>(8)</sup>

*Salmonella entérica*, la cual es de mayor preocupación a la salud pública, se divide en 6 subespecies:

*Salmonella entérica subespecie entérica (I)*

*Salmonella entérica subespecie salamae (II)*

*Salmonella entérica subespecie arizonae (IIIa)*

*Salmonella entérica subespecie diarizonae (IIIb)*

*Salmonella entérica subespecie houtenae (IV)*

*Salmonella entérica subespecie indica (VI)*

Si bien todas las bacterias del género *Salmonella* se consideran de interés a la Salud Pública, ya que pueden ser potencialmente patógenas, los microorganismos notificados con mayor frecuencia son *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium.<sup>(19)</sup>

### 3.1.2 Estructura antigénica

Básicamente la estructura de *Salmonella* posee dos clases de antígenos principales, los cuales son: antígenos O (somáticos) y antígenos H (flagelares).

**Antígenos O.** Son los antígenos de la pared bacteriana, de naturaleza polisacárida.

#### **Antígenos H**

Son antígenos constituidos por una proteína, la flagelina, cuya composición en aminoácidos es constante para un tipo antigénico determinado.<sup>(29)</sup>

### 3.2 Epidemiología de salmonelosis no tifoideas

La salmonelosis es una de las enfermedades transmitidas por los alimentos que con más frecuencia se notifican en todo el mundo. Esta enfermedad se caracteriza por diarrea, fiebre, dolores o calambres abdominales, vómitos, cefalea y náuseas, estos síntomas pueden durar hasta una semana. El período de incubación varía entre 8-72 horas. Una pequeña proporción de las personas infectadas pueden presentar el síndrome de Reiter, enfermedad que se caracteriza por síntomas de dolor articular, irritación ocular y micción dolorosa.<sup>(11)</sup> Cada año hay cerca de 17 millones de casos de gastroenteritis aguda o diarrea debido a salmonelosis no tifoidea con 3 millones de muertes.<sup>(8)</sup> En El Salvador, según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (VIGEPES) se han registrado 2,140,549 casos de diarreas y gastroenteritis, 3,073 casos de fiebre tifoidea y 1,697 intoxicaciones alimentarias entre los años 2012-2015, siendo el departamento de San Salvador quien reporta el mayor número de casos, los cuales podrían ser causados por *Salmonella* spp.<sup>(32)</sup>

### 3.3 Fuentes de *Salmonella*

**Humanos:** Las heces de personas infectadas pueden contener un gran número de *Salmonella* y puede excretarlo hasta por 3 meses.

**Animales:** *Salmonella* está presente en el intestino de pájaros, reptiles, tortugas, insectos (ocasionalmente), pollos, pavos, cerdos. Puede infectar a los humanos por consumo de alimentos contaminados o contacto directo. El pollo y el cerdo son reconocidos como los principales reservorios de *Salmonella*.

**Alimentos:** La carne de pollo y otros tipos de carne (res, pavo) provenientes de animales infectados son un importante vehículo de salmonelosis, así como también lo son otros alimentos de origen animal como los huevos. Además, se ha asociado a frutas y vegetales como los melones, mangos, tomates, espinacas, lechugas y semillas germinadas (soya). <sup>(8)</sup>

**3.4 *Salmonella* en pollo:** Las aves de corral desempeñan un importante papel como vehículos de transmisión de los casos de salmonelosis en humanos. El pollo para asar es el principal tipo de ave de corral que se consume en muchos países, incluyendo El Salvador. *Salmonella* puede residir en el tracto intestinal de los animales, incluyendo las aves de corral, así, la piel y la carne de las canales a menudo se contaminan por el agente patógeno durante el sacrificio y la elaboración.<sup>(11)</sup>

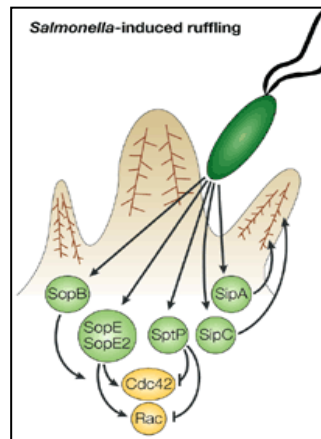
Según Food Safety and Inspection Service, USDA, por sus siglas en inglés, actualmente los eventos que causan contaminación de las carcasas crudas no pueden ser eliminados por medio de la producción comercial y las prácticas de sacrificio empleadas en los Estados Unidos. Sin embargo, la contaminación puede ser minimizada, con la aplicación de prácticas sanitarias adecuadas y el uso de antimicrobianos durante las etapas del sacrificio y de la transformación de las carcasas en piezas y producto desmenuzado. <sup>(15)</sup>

### 3.5 Infección y patogénesis de *Salmonella*.

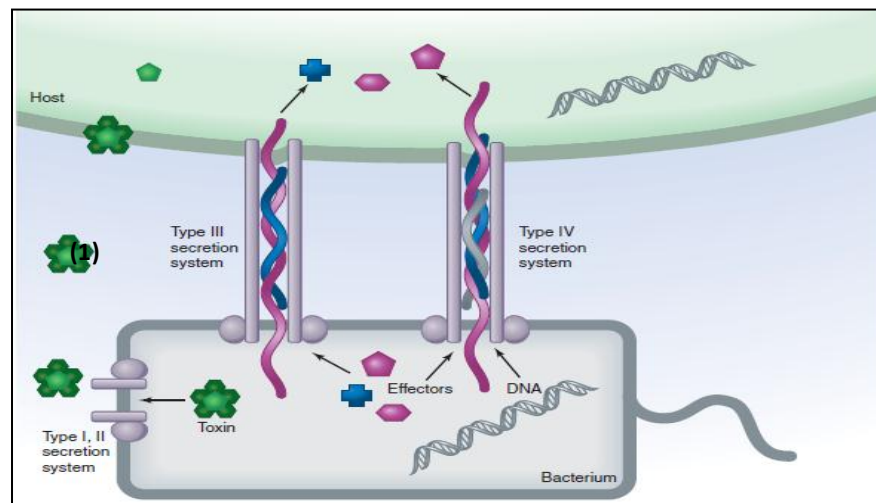
Durante el proceso infeccioso se presenta una interacción entre hospedero-microorganismo, los pasos que se presentan en dicho proceso son adhesión, invasión, replicación, resistencia a los mecanismos de defensa y daño al hospedero<sup>(14)</sup>

Los microorganismos casi siempre ingresan por vía oral, generalmente por medio de alimentos o bebidas contaminadas. Después de la ingestión, la bacteria resiste el ambiente ácido del estómago y seguidamente coloniza el intestino delgado <sup>(31)</sup>, *Salmonella* establece un estrecho contacto con el borde en cepillo del epitelio intestinal, antes del contacto inicial, el borde permanece intacto. Sin embargo, cuando la bacteria se acerca a la superficie epitelial, las microvellosidades circundantes empiezan a degenerarse con elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado *ruffling* (rizado o formación de ondulamiento) Ver Figura No. 2. Aquí, por medio del sistema de secreción Tipo III, muy utilizado por bacterias Gram negativas, los efectores liberados en el citosol de las células hospederas interactúan con las proteínas de dichas células para re arreglar el citoesqueleto de actina e inducir cambios morfológicos que causan que estas células, normalmente no fagocíticas, internalicen la bacteria en un proceso llamado invasión. <sup>(32)</sup>.Ver Figura No.3.

*Salmonella* posee dos sistemas de secreción tipo III que son codificados en dos distintos grupos de genes llamados islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI 1 y SPI 2), los cuales parecen jugar dos papeles diferentes durante la patogénesis, SPI 1 es requerida para la penetración inicial a la mucosa intestinal y SPI 2 es necesaria para los estados subsecuentes de infección sistémica. <sup>(32)</sup>.Una vez *Salmonella* ha superado las barreras y penetra en las células del hospedero, se necesitan aproximadamente  $10^6 - 10^8$  bacterias para desarrollar la enfermedad sintomática. Aunque intervienen otros factores como el tipo de cepa, el tipo de alimento o el estado fisiológico del huésped. <sup>(31)</sup>



**Figura No 2.** Algunas proteínas efectoras involucradas en los rearrreglos del citoesqueleto (ruffling): SipA, SopE, SopE2 y SopB.



**Figura No 3.** Sistemas de secreción bacteriana. (1) Sistema de secreción Tipo III. Maquinarias dedicadas a la translocación de proteínas que permiten a las proteínas bacterianas de patogenicidad (Efectores) ser liberadas directamente en el citosol de células hospederas eucariotas. (Alto M., Orth K., 2016)

## **3.6 Métodos de detección de *Salmonella spp.* en alimentos**

### **3.6.1 Método Convencional**

Existen diversas pautas que establecen la forma en que se desarrolla el método tradicional de detección de *Salmonella spp.* en muestras de alimento, en general este proceso se compone de cuatro fases.

i) Preenriquecimiento en un medio líquido no selectivo; ii) enriquecimiento en un medio líquido selectivo; iii) siembra en placa e identificación presuntiva y iv) confirmación de la identidad mediante pruebas bioquímicas y serológicas.

Los resultados son expresados en términos cualitativos, es decir presencia o ausencia del patógeno en una determinada cantidad de muestra, en un proceso cuya duración va, generalmente, desde cuatro hasta nueve días. <sup>(22)</sup>

**3.6.1.1 Enriquecimiento no selectivo o preenriquecimiento:** Esta etapa varía para cada tipo de alimento, ya que a partir de 1961 se inició el uso de Caldo Lactosado (CL), sin embargo, después de diversos estudios se concluyó que la composición de dicho medio no era tan crítica como se suponía, por lo cual se decidió el uso de Agua Peptonada Bufferada (BPW) como medio de cultivo para propósitos generales.

El objetivo del pre enriquecimiento es favorecer la reparación y el crecimiento de las células que han sido dañadas por las diferentes condiciones de tratamiento o almacenamiento al que pudo haber estado sometido el alimento previo al análisis (calor, congelación, desecación, preservantes, presión osmótica elevada o fluctuaciones de temperatura). La importancia de esta fase radica en que si no se incluyera, no se detectarían células recuperables que pueden causar infección si el alimento es manipulado incorrectamente. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés), y la Administración de Alimentos y Medicamentos

(FDA por sus siglas en inglés), recomiendan métodos que incluyen un pre enriquecimiento de 6 a 24 horas con Agua Peptonada Bufferada.

**3.6.1.2 Enriquecimiento selectivo:** En esta etapa se inocula el cultivo de pre-enriquecimiento en un medio de enriquecimiento con el fin de favorecer la proliferación de *Salmonella* al provocar una represión selectiva o inhibición del crecimiento de otros microorganismos competitivos tales como coliformes, *Proteus* y *Pseudomonas*, que de estar presentes en el alimento analizado, superarían a *Salmonella*. Algunos procedimientos recomiendan más de un caldo selectivo y una temperatura igual a 43°C para garantizar el aislamiento de dicho patógeno.

El caldo Rappaport-Vassiliadis contiene agentes selectivos como el Verde de Malaquita y Cloruro de Magnesio que favorece el análisis de alimentos con una alta carga de microbiota competitiva, así como alimentos con baja carga microbiana. Como medios de cultivo se recomienda usar caldo Selenito-Cistina y Caldo Tetracionato. En los medios de enriquecimiento selectivo el Cloruro de Magnesio y el Verde de Malaquita favorecen el crecimiento de *Salmonella*, y provocan la represión de la microbiota competitiva.

**3.6.1.3 Aislamiento en medios sólidos, selectivos y diferenciales.**

En esta fase también es usual emplear dos medios diferentes. Los agares selectivos poseen sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, entre dichas sustancias están las sales biliares o el Desoxicolato (inhibidor de bacterias gram positivo), el Verde Brillante, etc. Estos medios también poseen indicadores que colorean las colonias o el medio que las rodea, para diferenciar caracteres bioquímicos de las unidades formadoras de colonias (UFC) que

crezcan en él. Así, *Salmonella* generalmente es incapaz de fermentar la lactosa y es capaz de producir Sulfuro de Hidrógeno, por lo que se recomienda el uso de dos medios sólidos selectivos y diferenciales distintos para evidenciar estas reacciones. Entre los medios sólidos empleados se encuentra el agar Sulfito Bismuto (BSA, en el que se observan colonias marrones o grises a negro a veces con brillo metálico, siendo el agar de elección para *Salmonella Typhi*), el agar Hecktoen enteric (HE, en donde se observan colonias verdes traslúcidas con y sin centro negro, por la producción de sulfuro de hidrógeno que posteriormente reacciona con el hierro, formando sulfuro de hierro), el agar MacConkey (MK, donde se observan colonias incoloras, sin embargo, pueden presentarse biotipos lactosa positivo que aparecen de color rosado), el agar Verde Brillante (donde se observan colonias azul-verde a azules con o sin centro negro o completamente negras), el agar Rambach (colonias rojas brillantes, excepto *Salmonella Typhi* que es incolora) el agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD, que produce colonias rosadas transparentes, con y sin centro negro), entre otros medios.

**3.6.1.4 Confirmación Bioquímica y Serológica:** en la confirmación bioquímica, se inoculan las colonias sospechosas, dentro de medios de cultivo que promueven la expresión de reacciones bioquímicas específicas, tal es el caso de las pruebas TSI/LIA, citrato, Voges Proskauer, entre otros.

La confirmación serológica, se basa en la capacidad de aglutinación de la bacteria frente a determinados antisueros específicos de los antígenos somáticos (O), flagelar (H) y capsular (Vi)<sub>(1)</sub>



#### **3.6.1.4.1 Identificación bioquímica**

Los microorganismos para crecer requieren de polimerización de proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos; estos elementos deben encontrarse preformados en el medio donde se encuentra el microorganismo o deben ser sintetizados por la propia célula. Para realizar el metabolismo se requiere además la maquinaria biosintética para transformar los substratos en materiales básicos o compuestos utilizables para la célula, y la energía para realizar las reacciones químicas.

En la identificación final de *Salmonella* las colonias sospechosas observadas en el medio de cultivo diferencial se someten a pruebas de reacción bioquímica con el fin de confirmar la presencia de la bacteria. En general a *Salmonella*, se le realiza un conjunto de pruebas que incluyen producción de indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, Citrato, TSI, hidrólisis de la urea, deaminación de la fenilalanina, decarboxilación de lisina, arginina y ornitina, motilidad, hidrólisis de gelatina, utilización de malonato, fermentación de glucosa con producción de ácido y gas, fermentación de lactosa, sacarosa, manitol, dulcitol, salicina, adonitol, inositol, sorbitol, arabinosa, rafinosa, maltosa, xilosa, trehalosa, celobiosa, eritritol, hidrolisis de esculina, fermentación de melibiosa, de arabitol, de glicerol, utilización de acetato, lipasa, ADNasa, transformación nitrato-nitrito, oxidasa y fermentación de manosa.

#### **3.6.1.4.2 Diagnóstico presuntivo de *Salmonella***

Para iniciar el proceso de identificación de este microorganismo, se retoman tres pruebas bioquímicas básicas:

**TSI (triple azúcar hierro)**, es un agar diferencial basado en la fermentación de azúcares y la producción de H<sub>2</sub>S y gas. Contiene glucosa, sacarosa y lactosa; estas últimas en una concentración 10 veces mayor a la glucosa. El indicador de pH es el rojo de fenol, el cual vira a amarillo por formación de ácido a partir

del carbohidrato, el sulfato ferroso es un detector de la producción de ácido sulfhídrico. Por lo general *Salmonella* da como resultado de esta prueba una reacción alcalina/ácido con producción de H<sub>2</sub>S que se evidencia por el fondo negro del tubo (K/A H<sub>2</sub>S++); en ocasiones, como resultado de la fermentación de glucosa también hay producción de gas (28).

**LIA (agar lisina hierro)**, El fundamento de esta prueba es que los procesos de decarboxilación y deaminación en el medio de cultivo tienen lugar con la previa fermentación del carbohidrato que contiene el medio (glucosa) y la acidez producida por esta reacción, si el microorganismo posee las descarboxilasas necesarias, se produce la decarboxilación liberándose como producto final las aminas que alcalinizan el medio de cultivo, por otro lado si el microorganismo posee las deaminasas se efectúa la deaminación y el producto final son ácidos orgánicos que acidifican el medio de cultivo. *Salmonella* por lo general da como resultado bisel púrpura y fondo púrpura, (K/K), con producción de H<sub>2</sub>S y gas, es decir, posee la enzima lisina-decarboxilasa (28).

**Hidrólisis de Urea**, la urea es un compuesto orgánico nitrogenado que es transformado por algunos microorganismos, los cuales producen la enzima ureasa. Como resultado de esta actividad microbiana, el nitrógeno es liberado en forma inorgánica como moléculas de amoníaco. Cuando esta reacción ocurre el medio de cultivo se alcaliniza y el indicador de pH, permite percibir visualmente el cambio de coloración en el medio debido a la acidificación producido en el mismo. *Salmonella* no tiene la capacidad de hidrolizar la urea, por lo tanto, la prueba es negativa. Esta prueba se considera vital, en la diferenciación bioquímica entre *Salmonella sp* y *Proteus sp*. (28).

**3.6.1.4.3 Serotipificación de *Salmonella***, constituye un importante complemento de la identificación bioquímica y desde el punto de vista epidemiológico permite determinar la prevalencia de una serovariedad en

distintas zonas geográficas, como así también es de utilidad para el estudio de brotes y para conocer la fuente de infección y las vías de transmisión. El uso de reacciones antígeno – anticuerpo para la serotipificación de las bacterias se basa en que los microorganismos presentan diferencias en su constitución antigénica, aún entre grupos de microorganismos relacionados. Los microorganismos expresan una gran variedad de antígenos (Ags): componentes estructurales de la célula (pared, cápsula, fimbrias); productos de excreción (exotoxinas, enzimas extracelulares).

Químicamente, los antígenos pueden ser proteínas, hidratos de carbono y complejos de polipéptidos y carbohidratos. Como son moléculas complejas tienen más de una subestructura que puede servir como determinante antigénico. Debido a esto en los sueros inmunes se encuentran anticuerpos que reaccionan contra distintos determinantes antigénicos de la misma molécula.

La base de la serotipificación para todas las enterobacterias es similar: se pone en evidencia la presencia de antígenos somáticos, flagelares y capsulares. La serotipificación de cepas de *Salmonella enterica* involucra la identificación de antígenos somáticos de superficie (LPS, antígenos O) y antígenos flagelares (proteínas, antígenos H). La mayoría de las cepas de *Salmonella* expresan dos fases flagelares pero también se conocen variantes afásicas, monofásicas y trifásicas. La identificación de las serovariedades surge como consecuencia de la combinación antigénica de factores somáticos O y flagelares H, con el agregado del antígeno capsular Vi para unas pocas serovariedades y se presenta en el “Esquema de Kauffmann-White”<sup>(30)</sup>

**Antígenos somáticos (Ags O)** Están compuestos por complejos de fosfolípidos y polisacáridos; su composición es aproximadamente: 60% polisacáridos, 20-30% lípidos y 3,5-4% hexosamina. Son cadenas laterales de polisacáridos del lipopolisacárido de envoltura (LPS) que se encuentra en todos los microorganismos gram-negativos. La cadena de polisacáridos del Antígeno

O es un polímero de unidades repetidas de oligosacáridos (de 3 a 5 azúcares) lineales o ramificados. La naturaleza de los grupos terminales y el orden en que se encuentran las unidades repetidas de la cadena determina la especificidad antigénica somática de la bacteria. Como esta estructura difiere ampliamente entre las distintas serovariedades, hay diferencias en la especificidad antigénica O. Estos antígenos son termoestables y resistentes a ácidos diluidos y alcohol. La estructura somática se denomina con la letra O seguida de números arábigos separados por comas, por ej. *S. Typhimurium* O:1,4,5,12.

**Antígenos Flagelares (Ags H)** El flagelo es una estructura compleja que consiste en un cuerpo basal, un segmento de unión (“hook”) y un filamento. El cuerpo basal ancla el flagelo a la envoltura de la célula y el “hook” une el cuerpo basal con el filamento. En la serotipificación flagelar de *Salmonella* se usa solamente la especificidad antigénica del filamento. El filamento está constituido por flagelina, proteína de alto peso molecular. En *Salmonella* se han encontrado más de 60 especificidades antigénicas flagelares. Las diferencias antigénicas surgen debido a variaciones en la estructura primaria (contenido en aminoácidos y orden de ubicación) de las distintas moléculas de flagelina. Estos antígenos son sensibles al calor. Unas pocas serovariedades de *Salmonella* poseen una sola fase flagelar, esas cepas se llaman monofásicas, por ej. *Salmonella* Enteritidis (9,12:g,m:-), *Salmonella* Typhi (9,12 [VI]:d:-); pero la gran mayoría de las serovariedades tienen dos fases flagelares o sea son cepas difásicas; por ej., *Salmonella* Typhimurium (1,4,5,12:i:1,2) y *Salmonella* Hadar (6,8:z10:e,n,x), que expresan la fase 1 (constituida en los ejemplos por los antígenos: i ó z10 ) y la fase 2 ( por los antígenos: 1,2 y e,n,x respectivamente)<sup>(30)</sup>.

**Antígeno Capsular (Ag Vi)** El antígeno capsular es un polisacárido, constituido por ácido N-acetilglucosaminourónico. Entre los antígenos capsulares de las Enterobacterias, el Vi es el más importante en el género *Salmonella*. Se

encuentra en sólo tres serovariedades: S. Typhi, S. Paratyphi C y en algunas cepas de S. Dublin. <sup>(34)</sup>

Todo esto es laborioso, la obtención de resultados puede tomar días o semanas y, adicionalmente, presentan baja sensibilidad. Aunado a ello, se ha demostrado que algunas células bacterianas pueden entrar en un estado viable pero no cultivable (VPNC), debido al procesamiento al que se sujeta el alimento, lo que imposibilita el uso de los métodos de cultivo como herramienta de diagnóstico. Una serie de métodos alternativos, rápidos y sensibles para la detección, identificación y cuantificación de patógenos transmitidos por alimentos han sido desarrollados para superar estos inconvenientes.<sup>(6)</sup>

### 3.6.2 Métodos alternativos

Se caracterizan por presentar rapidez de análisis o respuesta, automatización, permitir procesar un número elevado de muestras por unidad de tiempo, y son en general fáciles de utilizar, precisos (sensibilidad y especificidad al menos similares al método tradicional) y económicamente rentables. En la tabla No.1. se reflejan los tiempos requeridos para obtener un resultado negativo para un método convencional, y un resultado negativo o un presuntivo positivo para los métodos alternativos a evaluar en este estudio.

**Tabla No. 1.** Tiempos de análisis requeridos en métodos convencionales y métodos alternativos, para generar respuestas presuntivas.

Microorganismo	Método convencional ISO 6579:2002	Inmunoensayo visual VIA TECRA	Método molecular Assurance GDS
<i>Salmonella spp.</i>	96 horas	42 horas	(24-26) horas

La utilización cada vez más generalizada de las técnicas inmunológicas en el análisis de los alimentos para detectar la presencia de microorganismos, toxinas u otros metabolitos microbianos, es consecuencia del éxito previo que alcanzaron en el campo del diagnóstico clínico. Las técnicas inmunológicas son procedimientos analíticos basados en la visualización objetiva de la interacción entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo, y debido a su sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo coste, son especialmente útiles en el análisis microbiológico de los alimentos. En el desarrollo de un ensayo inmunológico se identifican tres etapas fundamentales: 1) preparación del antígeno; 2) obtención y evaluación del anticuerpo y 3) desarrollo de un inmunoensayo apropiado.<sup>(6)</sup>

### **3.6.2.1 Métodos basados en técnicas inmunológicas**

De todas las técnicas inmunológicas desarrolladas (aglutinación, inmunodifusión, inmunolectroforesis, radioinmunoensayo, inmunofluorescencia, etc.) la técnica inmunoenzimática de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) constituye en la actualidad la más ampliamente utilizada en el análisis microbiológico de los alimentos. Se caracteriza por el empleo de marcadores enzimáticos para la detección y amplificación de las reacciones antígeno-anticuerpo.

En esta técnica, uno de los elementos de la reacción inmunológica (antígeno o anticuerpo) se fija a un soporte sólido, generalmente placas de poliestireno, polivinilo, polipropileno o nylon, que permiten su adsorción pasiva y la eliminación de los compuestos libres mediante lavado.

En algunos formatos, se utilizan membranas de nitrocelulosa como fase sólida, a las que se unen los antígenos mediante enlaces hidrofóbicos. Una vez inmovilizados los antígenos o los anticuerpos, la interacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante la reacción colorimétrica producida por la actividad de una enzima (conjugada al antígeno o al anticuerpo) al degradar el sustrato correspondiente. La medida de la absorbancia en los pocillos de la

placa de ELISA permite cuantificar la reacción inmunológica. Las enzimas más utilizadas en las técnicas inmunoenzimáticas son la peroxidasa de rábano, la  $\beta$ -galactosidasa, la glucosa oxidasa y la fosfatasa alcalina.<sup>(6)</sup>

Las técnicas inmunoenzimáticas se han desarrollado en diversos formatos (ELISA indirecto, ELISA competitivo y ELISA sandwich) atendiendo al componente de la reacción que se fija en primer lugar, la fase sólida utilizada, y si se emplean o no concentraciones limitantes de antígeno y anticuerpo.

En la identificación de microorganismos y/o sus toxinas o metabolitos, uno de los formatos más utilizados es la técnica de ELISA sándwich. En esta técnica, el anticuerpo se une a la fase sólida y, después de un periodo de incubación y lavado, se adiciona la muestra que contiene el antígeno. Después de un nuevo lavado que elimina los antígenos que no se han unido a la fase sólida, se añade un segundo anticuerpo marcado con una enzima. La unión del segundo anticuerpo al antígeno se cuantifica por la reacción colorimétrica resultante de la degradación del sustrato por la enzima. Conviene señalar que la mayor parte de estos ensayos requieren de la presencia en la muestra de  $10^3$  - $10^5$  UFC/g o mL, lo que implica que previamente a la realización del análisis es necesario proceder a un enriquecimiento de la muestra (16-24 horas) que permita la multiplicación del microorganismo diana hasta alcanzar el límite de detección.<sup>(22)</sup>

Una de las limitaciones de los inmunoensayos deriva de la necesidad de proceder a un enriquecimiento previo de la muestra que facilite la multiplicación del microorganismo diana.

### **3.6.2.2 Métodos moleculares**

Los principales avances en los ensayos de detección de patógenos en alimentos, basados en ácidos nucleicos, se produjeron a partir de 1980. Los primeros métodos de identificación molecular fueron la hibridación ADN-

ADN, el análisis de secuencias del ADNr 16S, la hibridación con una sonda específica y el análisis RFLP o ribotipificación.

En contraste con las características fisiológicas y bioquímicas, la identificación molecular se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión. Estos métodos moleculares se utilizan a menudo en asociación con la identificación microbiológica convencional.

El descubrimiento de la PCR, la clonación, la secuenciación y la tecnología de detección por fluorescencia, así como la accesibilidad a una gran cantidad de información en la web ayudó al desarrollo de nuevas herramientas moleculares, cuyo uso ha aumentado enormemente la habilidad para detectar y cuantificar bacterias patógenas en agua y alimentos, entre estas, muchas bacterias emergentes, como por ejemplo; *Escherichia coli* O157, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*, las cuales han representado una seria amenaza para la salud pública mundial. La segunda generación de métodos moleculares para la detección e identificación de géneros y especies son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR múltiple, la secuenciación de genes específicos, el análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado, entre otros.

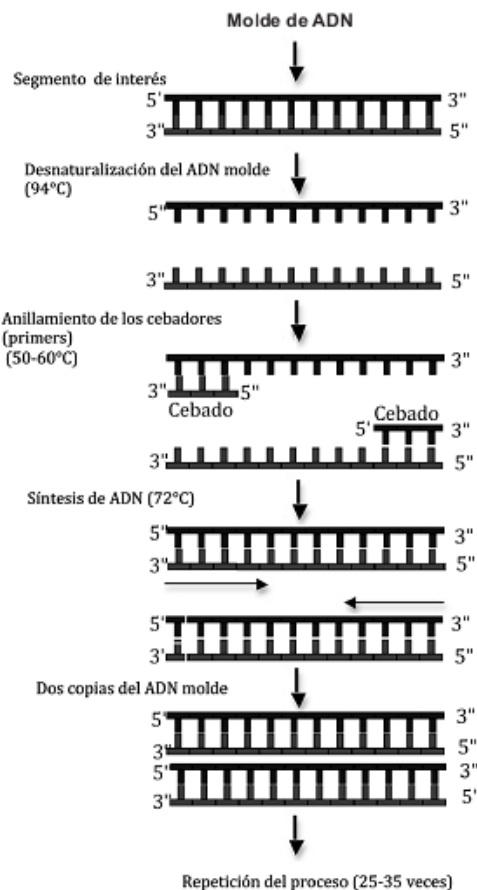
Recientemente, se ha dado un paso hacia las plataformas moleculares más sofisticadas para la identificación de microorganismos patógenos, incluyendo sistemas de amplificación in vitro en tiempo real, biosensores y microarreglos, los cuales han sido desarrollados o se están desarrollando para su uso como métodos rápidos en la detección de patógenos en alimentos. Algunos de los actuales métodos de detección molecular pueden ser empleados, además, en laboratorios o establecimientos clínicos, en sitios de observación, tales como la granja o el campo, en forma de kit todo en uno <sup>(14)</sup>.



### 3.6.3 Aplicación de técnicas moleculares en la detección e identificación de patógenos transmitidos por alimentos.

#### 3.6.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La enumeración de patógenos transmitidos por alimentos es un aspecto principal del diagnóstico molecular microbiológico, especialmente si quiere utilizarse para la evaluación cuantitativa del riesgo. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica de diagnóstico molecular más ampliamente utilizada debido a su protocolo rápido y de fácil uso (Figura No. 4). Por lo general, 2-3 horas son necesarias para completar una PCR, pero hoy en día se están desarrollando sistemas de PCR más avanzados para generar un resultado en cuestión de minutos. (30)



**Figura No.4** Etapas de técnica PCR.

### 3.6.3.1.1 Etapas de la PCR

La técnica de PCR se basa en el principio de complementariedad de bases del ADN y en la participación de la enzima polimerasa que permite la extensión del fragmento a amplificar, agregando nucleótidos en secuencia complementaria al ADN molde por medio de un proceso cíclico que comprende tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión.

Muchos ensayos de PCR en tiempo real se han desarrollado para patógenos de origen alimentario, ofreciendo una detección rápida, sensible y específica de una serie de agentes patógenos, tras el cultivo de enriquecimiento, así como su cuantificación.

Para la detección e identificación de *Salmonella* en alimentos también se han desarrollado varios ensayos de PCR. Un ensayo específico para la especie *Salmonella* Typhimurium, basado en la amplificación del gen *Og dH*.

Las ventajas de estos ensayos, junto con su facilidad de uso y la susceptibilidad a la automatización los hacen muy atractivos para su aplicación en alimentos, con el fin de superar la larga etapa de cultivo de enriquecimiento.

Es posible que la investigación y la evolución en este campo crezcan y conduzcan a ensayos de detección; rápidos, específicos y sensibles, que se puedan realizar directamente en muestras de alimentos en un futuro próximo.

Durante los últimos 5 años ha habido un número creciente de reportes en la literatura que describe el diseño y aplicación de la PCR en tiempo real para las bacterias patógenas comunes de transmisión alimentaria.

Por ejemplo, este tipo de prueba (con SYBR Green) se ha aplicado para la detección de *Salmonella*, con tiempos de ensayo de aproximadamente 2 horas, sin preenriquecimiento.

La PCR en tiempo real (con sondas TaqMano 5' exonucleasa) se han utilizado

para la confirmación de los cultivos de *Salmonella* y para la identificación de *Salmonella* en muestras de alimentos previamente cultivadas en caldos de enriquecimiento.

Existe un número creciente de kits de PCR en tiempo real, disponibles comercialmente para la detección de patógenos transmitidos por alimentos (Tabla No 2)<sup>(30)</sup>

**Tabla No.2** Ejemplos de kits PCR en tiempo real disponibles para bacterias

Nombre del Kit	Bacteria	Fabricante	Referencia
LightCycler® Kit de detección del género <i>Listeria</i> (para alimentos)	<i>Listeria</i>	Roche	(-9,23)
LightCycler® Kit de detección para <i>Salmonella</i> (para alimentos)	<i>Salmonella</i>	Roche	(9,23,24)
LightCycler® Kit de detección de <i>E. coli</i> O157 (para alimentos)	<i>E. coli</i>	Roche	(9,23,24)
LightCycler® Kit de detección de <i>Campylobacter</i> (para alimentos)	<i>Campylobacter</i>	Roche	(-9,23)
Artus Kit PCR para <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Artus	(-9)
Artus Kit PCR para <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	Artus	(9)
Artus Kit PCR para <i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter</i>	Artus	(9)
TaqMan® Kit de detección para <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Applied BioSystems	(9,23)
TaqMan® Kit de detección para <i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	Applied BioSystems	(9,23)
TaqMan® Kit de detección para <i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i>	Applied BioSystems	(9,23,24)
TaqMan® Kit de detección para <i>Salmonella enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>	Applied BioSystems	(9,23,-24)
SureFood® <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Congen	(9)
SureFood® <i>Campylobacter</i> patógena	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. lari</i> , <i>C. coli</i>	Congen	(9)
SureFood® <i>Listeria</i> patógena	<i>L. monocytogenes</i>	Congen	(9)
BAX® System para <i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	Qualicon y Oxoid	(23)
BAX® System para <i>E. coli</i> O157	<i>E. coli</i> O157	Qualicon y Oxoid	(23,24)
BAX® System para <i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	Qualicon y Oxoid	(23,24,25)
BAX® System para <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	Qualicon y Oxoid	(23,24)
R.A.P.I.D.® LT real-time PCR system	<i>Salmonella</i> spp.	Idahotech	(24)
R.A.P.I.D.® LT real-time PCR system	<i>E. coli</i>	Idahotech	(23,24)
R.A.P.I.D.® LT real-time PCR system	<i>Listeria</i> spp.	Idahotech	(23)

patógenas transmitidas por alimentos.

### 3.6.3.1.2 Sistema de detección genética GDS Assurance

El GDS, es un sistema basado en la técnica PCR que utiliza la Preparación de la muestra basada en Separación inmunomagnética, sondas y primers altamente específicos y un termociclador Rotor-Gene Q basado en rotación que asegura ciclos de calentamiento y enfriamiento uniforme para todas las muestras. En la separación inmunomagnética se utilizan esferas plásticas que tienen incluidas en su interior partículas de hierro y en su superficie externa

anticuerpos específicos contra la *Salmonella* buscada. Las salmonelas se adhieren a los anticuerpos de la superficie de las esferas y éstas son magnéticamente atraídas por la pipeta Pick Pen que posee 8 imanes protegidos por puntas de plástico.

El Assurance GDS, sistema de detección genética para *Salmonella* Tq es un sistema automatizado de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de *Salmonella* en carne de res, carne de aves, productos marinos, productos lácteos, huevos, frutas y verduras, y superficies ambientales <sup>(6)</sup>.

### **3.6.3.1.3 Ventajas de las técnicas moleculares**

La identificación de los patógenos de transmisión alimentaria mediante métodos moleculares se ha vuelto cada vez más popular en aspectos de calidad y seguridad, y en la producción de alimentos, debido a que estas técnicas suelen ofrecer muchas ventajas.

La PCR, una de las técnicas más utilizadas en la detección e identificación de bacterias causantes de ETA, es fiel exponente de tales alcances; presenta rapidez, buen límite de detección, especificidad y sensibilidad, fácil automatización y capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestras. Para el caso de algunos microorganismos, la PCR no requiere condiciones anaeróbicas en comparación con el método de cultivo clásico.

Adicionalmente, a través de los métodos moleculares se identifican microorganismos que no pueden ser estudiados por técnicas convencionales o que no pueden cultivarse en substratos artificiales.

Asimismo, no se puede pasar por alto que los microorganismos transmitidos por alimentos están cambiando constantemente, debido a su inherente capacidad de evolucionar y su sorprendente habilidad para adaptarse a las diferentes formas de estrés.

Por lo tanto, la seguridad alimentaria debe ser vista como un proceso continuo, influenciado por factores ambientales, socioeconómicos, políticos y culturales.

En este sentido, los métodos moleculares, sin duda alguna, pueden ayudar en la detección de patógenos en alimentos.

Muchas de estas técnicas son mejoradas con el fin de subsanar los inconvenientes encontrados, dando paso a nuevos y variados métodos. Por ejemplo, a nanotecnología se está convirtiendo en el estándar para los ensayos de diagnóstico y su combinación con anticuerpos monoclonales, junto a la técnica de la PCR, ha generado resultados muy específicos y sensibles. (30)

#### **3.6.3.1.4 Limitaciones de las técnicas moleculares**

Entre las desventajas de los métodos moleculares se puede citar, en primer lugar, que aún no están ampliamente incorporados en los métodos estandarizados, por lo cual resultan inadecuados en algunos casos. Adicionalmente, requieren, en comparación con los métodos de cultivo, equipos y reactivos costosos.

Estas técnicas también son relativamente complicadas; necesitan experticia y utilizan productos químicos peligrosos, por lo que el análisis rutinario de muchas muestras resulta poco práctico.

Debido a la falta de protocolos estandarizados y a la calidad variable de equipos y reactivos, la metodología tiene dificultades para pasar de expertos a usuarios finales de los laboratorios.(30)

Otros factores que limitan la aplicación de PCR, y de otros métodos moleculares, en la detección e identificación de microorganismos patógenos en alimentos, destaca la presencia de sustancias que pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la reacción. La existencia de tales inhibidores en alimentos, muestras clínicas y ambientales ha sido reportada por varios autores. Estos pueden actuar a diferentes niveles durante el proceso de extracción y amplificación de los ácidos nucleicos y, en consecuencia, puede producir la subestimación de la carga bacteriana, así como resultados falsos negativos. (14).

Cabe resaltar que para el análisis de alimentos por métodos moleculares, cuando se obtiene un resultado positivo, este se considera presuntivo, y siempre se debe confirmar por el método convencional.

En los métodos basados en la PCR, la ADN polimerasa es probablemente el sitio blanco más importante de las sustancias inhibidoras. La generación de resultados positivos por la amplificación in vitro de ADN procedente de organismos muertos, presentes en muestras de alimentos, es otra limitación potencial. No obstante, la utilización del ARNr como secuencia blanco puede ofrecer una solución a este inconveniente.

### **3.7 Verificación de métodos alternativos**

Los métodos estándar tradicionales, usados para identificar grupos de organismos o géneros, se basan principalmente en la obtención de cultivos puros a partir de la habilidad de los microorganismos para crecer en un medio adecuado, estos son métodos bastante provechosos, aunque requieren una gran cantidad de tiempo, muestras y costos elevados.

Durante la validación y comparación de métodos es necesario medir una serie de parámetros que indicarán si el método es el adecuado o no, según sean las condiciones del laboratorio y los objetivos que este pretenda alcanzar. Los métodos de ensayo microbiológicos cualitativos, son métodos en los que el resultado se expresa en términos de ausencia/presencia; para este tipo de métodos, deberán medirse los siguientes parámetros, durante su comparación:

La especificidad, se define como la capacidad del método para diferenciar precisa y específicamente el compuesto de interés, en presencia de los demás componentes, que se espera esté presentes en la matriz de la muestra

La especificidad también suele definirse como la fracción del número total de cultivos o colonias negativas que son asignados correctamente con el método utilizado.

La sensibilidad, definida como la fracción del número total de cultivos o colonias

positivas que son asignados correctamente con el método utilizado.

En cuanto al Límite de detección, este es un número expresado en unidades de concentración que describe el más bajo nivel de concentración de la sustancia o microorganismo que puede determinarse como estadísticamente diferente del blanco analítico.

Otra definición se refiere a este como la concentración mínima del microorganismo en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas .(30)

### **3.7.1 Proceso de verificación de un método alternativo**

Según el estándar ISO 16140:2003 la validación corresponde a “la demostración, con la confianza adecuada, que los resultados obtenidos por el método alternativo son comparables a los obtenidos utilizando el método tradicional” (7).

El objetivo es buscar el grado de correspondencia que hay entre el resultado obtenido con el método tradicional y la respuesta obtenida con el método alternativo en una misma muestra. El procedimiento de validación consta de dos etapas: un estudio comparativo intralaboratorio en el que el método que se quiere validar es comparado con el método de referencia, y un estudio interlaboratorio (ISO 16140, 2003), y se lleva a cabo de acuerdo a procedimientos de diversos organismos internacionales. Mientras que, la Food and Drug Administration de EE.UU. (FDA, 2011) define la verificación como “la confirmación mediante examen y la presentación de pruebas objetivas que los requisitos establecidos en la validación se cumplen al interior de un laboratorio”. De esta forma, la verificación se realiza en aquellos dispositivos de diagnóstico microbiológico cuyos parámetros de desempeño han sido plenamente validados por un organismo de acreditación independiente, por ejemplo, la “Association of Official Analytical Chemist – Official Methods of Analysis” (AOAC-OMA por sus siglas en inglés), Association Française de Normalisation (AFNOR), European

Validation and Certification Organisation (MICROVAL), entre otros.

La verificación se realiza en cada matriz de alimento en la cual será utilizado el nuevo método.

Conforme al estándar ISO/IEC 17025:2005 “Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración” el laboratorio debe validar el nuevo método alternativo para confirmar que éste es apto para el fin previsto. Sin embargo, de acuerdo al estándar ISO 16140:2003, si el método ha sido validado previamente y se desea emplearlo para uso interno del laboratorio, puede ser adecuada una validación interna comparativa del método alternativo, menos exigente que la establecida en dicho estándar (ISO 16140,2003).

Para métodos cualitativos, deben evaluarse los siguientes parámetros:

**3.7.1.1Sensibilidad:** Fracción del número total de cultivos o colonias positivos que son correctamente asignados con el método utilizado.

**3.7.1.1Especificidad:** Fracción del número total de cultivos o colonias negativos que son correctamente asignados con el método utilizado.

**3.7.1.1Tasa de falsos positivos:** es la probabilidad o frecuencia con que la muestra sea asignada como positiva, cuando en realidad es negativa.

**3.7.1.1Tasa de falsos negativos:** es la probabilidad o frecuencia con que una muestra conocida como positiva, sea asignada como negativa por el método.<sup>(6)</sup>

Otro de los parámetros que se emplean ampliamente para caracterizar el rendimiento del método, lo constituye la Exactitud Relativa, denominada también Eficacia Relativa, la cual mide el grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y la respuesta obtenida por el método alternativo al trabajar con muestras idénticas <sup>(7)</sup>.



### 3.8 Resultados discordantes

Según ISO 16140:2003, al tener resultados discordantes, es decir; una tasa de falsos positivos y falsos negativos elevada, es necesario recurrir a las herramientas de análisis que dicha norma provee, considerando que la exactitud relativa de un método determinado, debe evaluarse ampliamente, sin limitarse únicamente al test de McNemar.

Para ello, se deben contar el número de resultados discordantes, que están constituidos por las desviaciones positivas, o falsos positivos, y las desviaciones negativas, o falsos negativos.

Y de ahí aplicar un análisis específico para determinar si los métodos son comparables entre sí, considerando el equilibrio entre sensibilidad y especificidad. Ver las especificaciones en el apartado de metodología.

### 3.9 Diferencias significativas entre métodos

Según la AOAC, para determinar si existen diferencias significativas entre los métodos alternativos evaluados y el Método convencional (de referencia), para métodos cualitativos, se utiliza la prueba de McNemar (una prueba de Chi cuadrado  $\chi^2$ ) que es usada para comparar las proporciones de los métodos. Es así que, la proporción de positivos confirmados por el método alternativo no debe ser estadísticamente diferente de la proporción de positivos confirmados por el método de referencia.

Chi cuadrado, como se define por McNemar, es

$$: \chi^2 = \frac{(|a - b| - 1)^2}{a + b}$$

Donde, a = muestras de prueba positivas por el método alternativo pero probadas como negativas por el método de referencia.

b= muestras probadas como negativas por el método alternativo pero confirmadas como positivas por el método de referencia.

Grados de libertad (g) =1

Un valor de Chi cuadrado  $<3.84$  indica que las proporciones positivas para el método alternativo y el de referencia no son estadísticamente significativas al 5% de nivel de significancia. En cambio, un valor de Chi cuadrado  $\geq 3.84$  indica que la proporción de positivos confirmados por el método alternativo y por el de referencia difiere significativamente a una  $P \leq 0.05$ .

**CAPITULO IV**  
**METODOLOGIA**

## **4.0 METODOLOGIA**

### **4.1 Metodología del estudio:**

El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Referencia, específicamente en el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Toxicología. La investigación fue experimental debido a que se retomaron datos obtenidos de los análisis microbiológicos realizados en las muestras de carne fresca de pollo.

Así mismo fue un estudio transversal, esto debido a que los datos obtenidos reflejaron la presencia del patógeno en estudio en un período de tiempo determinado.

### **4.2 Universo y muestra:**

**4.2.1 Universo:** supermercados del área Metropolitana de San Salvador, específicamente en los municipios de San Salvador y Mejicanos que comercializan carne de pollo.

**4.2.2 Muestra:** carne fresca de pollo, muslo-pierna y pechuga de los supermercados seleccionados.

#### **4.2.2.1 Tamaño de muestra:**

El tamaño de muestra se determinó con base a un criterio derivado de la fórmula de Cochram, que se deduce como un factor de corrección. Este consiste en utilizar como tamaño de muestra la doble raíz cuadrada del tamaño de muestra inicial = 300. Este tamaño de muestra (300) se refiere a la cantidad recibida en el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Toxicología como parte de la Vigilancia realizada en los supermercados del Área Metropolitana de San Salvador, a partir de esta cantidad se realizó el cálculo para estimar una cantidad de muestra menor y a partir de ella cumplir con el objeto de estudio.

La raíz cuadrada de 300 es 17.32 y la raíz de 17.32 es 4.16, luego este dato se introdujo en la siguiente fórmula:

$$n = N / \sqrt{\sqrt{N}}$$

$$n = N / \text{raíz cuadrada de } 17,32 = 300/4,16 = 72.11 \text{ ó } 72$$

Por lo tanto, como mínimo se debían analizar 72 piezas de carne fresca de pollo.

Debido a que la cantidad de insumos del laboratorio permitía analizar un poco más de la cantidad mínima calculada, se procesaron 96 muestras, con el fin de lograr una mayor representatividad, y observar el comportamiento de una mayor cantidad de ensayos, bajo las condiciones detalladas inicialmente, y con ello poder tener un mejor panorama de la respuesta de los métodos a evaluar.

#### **4.2.2.2 Puntos de muestreo**

Las muestras para análisis se obtuvieron de establecimientos comerciales pertenecientes a 3 diferentes cadenas de supermercados, ubicados en el municipio de San Salvador y Mejicanos. Debido a que este muestreo es parte de una Vigilancia ya dada, algunos establecimientos que jurisdiccionalmente pertenecen a dichos municipios son los que serán muestreados para este estudio, según calendarización previa.

Cada cadena fue identificada con las sigla C, seguida un literal (Ca, Cb, Cc). Luego para referirnos a cada establecimiento, se colocó un guión y a continuación de ello, un número correlativo.

Ejemplo: Para identificar al supermercado “1” de la cadena “a”, se abrevió Ca-1, se identificó el establecimiento “2” de la cadena “c” como Cc-2, y así en

sucesivo. Para observar la ubicación gráfica de los puntos de muestreo ver Anexo I.

De cada establecimiento se obtuvieron 8 piezas a ensayar, 4 correspondientes a pechugas y 4 a muslos.

Para la identificación de cada una de las muestras, se denominaron aquellas correspondientes a pechugas con la letra “P” y los muslos con la letra “M”. Esta denominación se acompañó del correlativo respectivo. Ver tabla No. 3.

**Tabla No. 3** Muestras tomadas según establecimiento.

MUESTRAS	CORRELATIVO	ESTABLECIMIENTO	MUNICIPIO
8	1P-4M	Ca-1	SAN SALVADOR
	5P-8M	Ca-2	MEJICANOS
	9M-12P	Cc-1	SAN SALVADOR
	13P-16M	Ca-3	SAN SALVADOR
	17P-20M	Ca-4	MEJICANOS
	21P-24M	Cb-1	MEJICANOS
	25P-28M	Ca-5	SAN SALVADOR
	29P-32M	Ca-6	SAN SALVADOR
	33P-36M	Ca-7	SAN SALVADOR
	37P-40M	Ca-8	SAN SALVADOR
	41P-44M	Ca-9	SAN SALVADOR
	45P-48M	Cb-2	SAN SALVADOR
<b>TOTAL</b>	96		

### 4.3 Metodología analítica

#### 4.3.1 Método convencional:

**Detección, aislamiento e identificación de *Salmonella spp.* en muestras de Alimentos** (Procedimiento según International Standard ISO 6579: 2002)

##### 4.3.1.1 Procedimiento

Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo

- Se pesó asépticamente 25 g de muestra y se mezcló con 225 mL de Agua peptonada 1% (AP 1%).
- Se incubó a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ / 18 h  $\pm$  2 h.

Enriquecimiento en medio líquido selectivo: La muestra obtenida en la etapa anterior, se inoculó en los siguientes medios líquidos:

- Caldo Rappaport - Vassiliadis (RVS): se incubó a  $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h  $\pm$  3 h.
- Caldo Muller – Kauffmann tetrionato/ novobiocina (MKTTn): se incubó a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h  $\pm$  3 h.

Aislamiento en medio selectivo y diferencial: Del cultivo obtenido en los medios de cultivo selectivos, se inocularon los medios sólidos selectivos por estriado en placa:

- Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)
- Otro medio sólido selectivo, complementario al XLD, apropiado para el aislamiento de *Salmonella* lactosa positiva y cepas de *Salmonella* Typhi y Paratyphi. El laboratorio debía elegir el medio a utilizar.

Para este caso, se utilizaron Agar Hektoen (HE) y Agar Sulfito Bismuto (SB).

- Las placas con Agar XLD se incubaron a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h  $\pm$  3 h. Los agares HE y Agar SB se incubaron durante 24 h  $\pm$  2 h a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Confirmación de las colonias presuntivas aisladas:

- Se examinaron las placas después de la incubación para la determinación de la presencia de colonias típicas de *Salmonella*, mediante los siguientes criterios:

**Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD):** Colonias rosadas con o sin centro negro. Muchos de los cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con centro negro grande, brillante, o pueden aparecer casi completamente negras.

**Agar entérico Hektoen (HE):** Colonias azul-verdosas a azules con o sin centro negro. Muchos de cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con centro negro grande, brillante, o pueden aparecer casi completamente negras.

**Agar Sulfito bismuto (SB):** Colonias café, grises o negras; a veces tienen brillo metálico. El medio alrededor usualmente se torna café al principio, pero puede volverse negro cuando el tiempo de incubación aumenta, produciendo el llamado “efecto halo”.

#### 4.3.1.2 Confirmación bioquímica

Para la confirmación se tomó de cada placa de agar selectivo y diferencial: XLD, HE y BS al menos una colonia típica o sospechosa de *Salmonella*, y se procedió como se indica a continuación.

Si la primer colonia ensayada resultaba negativa, se picaban 4 colonias más, para ser sometidas al mismo procedimiento. Se hizo énfasis en la utilización de cultivos puros.

Con un asa en punta estéril, se tocó ligeramente el centro cada colonia aislada, y se inoculó en Agar inclinado TSI, Agar inclinado LIA y Caldo Urea:

**Agar TSI:** Se inoculó utilizando asa en punta por estriado del bisel y punción en



el fondo. Se incubaron los tubos con las tapas sin apretar para mantener condiciones aeróbicas durante la incubación y así prevenir la producción excesiva de H<sub>2</sub>S. Se incubaron a 35°C ± 1°C durante 24 h ± 2 h.<sup>(28)</sup>

**Agar LIA:** Con la misma asa y sin flamear, se inoculó en Agar LIA inclinado por punción en el fondo dos veces y luego estriado en el bisel. Se incubaron los tubos con las tapas sin apretar para mantener condiciones aeróbicas durante la incubación y así prevenir la producción excesiva de H<sub>2</sub>S. Los tubos de Agar LIA inoculados se incubaron a 35°C ± 1°C durante 24 h ± 2 h.

(Era importante verificar que el agar inclinado LIA tuviese un fondo profundo de alrededor 4 cm, ya que la reacción de la descarboxilación de lisina es estrictamente anaerobia). Se almacenaron en refrigeración, las placas de agar selectivo picadas. <sup>(28)</sup>

**Caldo Urea:** Con asa en punta estéril, se inoculó el crecimiento de cada prueba presuntiva positiva de TSI, en tubos conteniendo Caldo Urea. Se incubó a 35°C ± 1°C durante 24 h ± 2 h. Debido a que, esporádicamente, tubos con caldo urea sin inocular se tornan rojo-púrpura (prueba positiva) estando en reposo, como control interno se incluyeron tubos de dicho caldo sin inocular y fueron incubados a 35°C ± 1°C durante 24 h ± 2 h.<sup>(28)</sup>

Se verificaron las características fenotípicas típicas del género *Salmonella*, que produce en TSI reacción alcalina (color rojo-rosado) en el bisel y coloración amarilla en el fondo, con producción de H<sub>2</sub>S (ennegrecimiento del agar) y gas. En Agar LIA para los aislamientos presuntivos positivos se verificó que el medio se mantuviese morado y que presentara producción de H<sub>2</sub>S (ennegrecimiento del agar). *Salmonella* en caldo Urea resulta ser reacción negativa, es decir que no hay viraje de color en el medio. Para la confirmación completa por propiedades bioquímicas se utilizaron galerías miniaturizadas API 20E, para ello

se siguieron las instrucciones del fabricante. Ver anexo No. 19.

De acuerdo a resultados obtenidos se indicaba Presencia o Ausencia de *Salmonella spp*/25 g.

#### **4.3.1.3 Control de calidad**

- **Control Positivo**

Se realizó una vez al día durante la ejecución de la prueba, para ello, se inoculó como control positivo la cepa de *Salmonella* ATCC 14028 y se procedió de la misma manera que la muestra. Criterio de aceptación: crecimiento característico del microorganismo en estudio.

- **Control Negativo**

Se realizó una vez al día cada vez que se efectuaba la prueba, se inoculó como control negativo la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922y se procedió de la misma manera que la muestra. Criterio de aceptación: crecimiento pobre no característico a *Salmonella* o ausencia de crecimiento en placa.

#### **4.3.2 Técnica de Biología molecular:**

##### **Metodología para el aislamiento, detección e identificación de *Salmonella spp* mediante método screening Assurance GDS**

Las áreas de trabajo requeridas y utilizadas para el desarrollo de este método fueron:

1. Área de preparación de Reactivos.
2. Área para manipulación de muestras.
3. Área para manejo del Equipo GDS.

#### 4.3.2.1 Preparación de la muestra y pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo

- Se pesó asépticamente 25 g de muestra y se mezcló con 225 mL de Agua peptonada 1%.
- Se procedió a homogenizar la mezcla en Stomacher por 30 segundos, seguido de un período de incubación a (35-37) °C por 18 h-24 h.

#### 4.3.2.2 Realización del método mediante Assurance GDS *Salmonella*

**NOTA:** Se procedió al cambio de guantes previo al manejo de reactivos.

- Se agitó en Vortex el **Reactivo de Concentración del kit**. De esta manera las partículas quedaron suspendidas en forma homogénea para ser dispensadas. Inmediatamente se transfirieron 20µL a cada pocillo del bloque de muestras, de acuerdo al número de pruebas a realizar (1 pocillo/muestra). Para ello se utilizó una pipeta repetidora y puntas de 0.5 mL de capacidad. Se cubrieron los pocillos con una tira de película adhesiva para proteger el contenido.
- Por medio de una pipeta repetidora con puntas estériles de 10 mL de capacidad, se dispensaron 0.5 mL de BHI en pocillos adicionales del bloque de muestras (1 pocillo/muestra). Fueron cubiertos con una tira de película adhesiva para proteger el contenido y reservar para la siguiente etapa.
- Cuidadosamente se removió la película adhesiva de los pocillos que contenían el reactivo de concentración y se adicionó 1 mL de la muestra incubada en AP 1%, verificando que la muestra no contenía partículas suspendidas. Se cubrieron los pocillos con una película adhesiva diferente a medida se iba adicionando la muestra.
- Luego de finalizado el paso anterior, se retornaron las muestras en el caldo de pre-enriquecimiento (AP 1%) a la incubadora.

- Se agitó mediante Vortex el bloque de muestras por aproximadamente 900 rpm durante (10-20) minutos.
- Pasado el tiempo de agitación, cuidadosamente se retiraron y descartaron las películas adhesivas que cubrían los pocillos de las muestras y los pocillos del caldo BHI.
- Se cargaron las puntas para PickPen en la pipeta Pickpen, verificando que las puntas estuvieran firmemente colocadas en las mangas acarreadoras de dicha Pipeta. Para cada muestra, se extendieron los imanes de la PickPen e insertaron las puntas en los pocillos de las muestras, se agitó suavemente durante 30 segundos mientras se movió continuamente hacia arriba y abajo desde la superficie hasta el fondo del pocillo. Se golpeó suavemente la punta Pickpen contra un borde de los pocillos para eliminar el exceso de gotas de la muestra.
- Posteriormente se transfirió la PickPen cargada al bloque de pocillos de muestra correspondientes conteniendo el caldo BHI. Con las puntas de la PickPen sumergidas se retrajeron los imanes y se agitó suavemente. Se cubrieron los pocillos con una nueva tira de papel adhesivo.
- Se incubaron los pocillos por 4 horas a (35-37) °C.  
NOTA: el enriquecimiento con BHI durante 4 horas, fue requerido debido a la naturaleza de la muestra, que posee una gran cantidad de flora acompañante. Para proceder con otras matrices de alimentos en las cuales se puede aplicar esta metodología ver anexo No.
- Antes de finalizar el periodo de incubación, se dispensaron 45µL de **Buffer de resuspensión Tq del kit**, en la microplaca de resuspensión de acuerdo al número de pruebas a realizar. Se cubrió con una película adhesiva protectora.
- Una vez terminada la incubación haciendo uso de la PickPen, se transfirieron las partículas contenidas en caldo BHI a los pocillos de microplaca de resuspensión que previamente se les había adicionado el

**buffer de resuspensión.** Se cubrió nuevamente con la película adhesiva.

**NOTA:** *Se cambiaron los guantes, previo a la transferencia a los tubos de amplificación.*

- Se retiró del congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , el bloque frío de gel, el cual, posee la característica de mantenerse de color morado cuando está congelado y conforme va aumentando la temperatura se torna color rosa.
- Se abrió la bolsa de aluminio con los tubos de amplificación y se colocaron rápidamente en el bloque frío de gel, la cantidad necesaria de acuerdo al número de muestras analizadas.
- Se transfirieron  $30\ \mu\text{L}$  de la muestra contenida en el buffer de resuspensión a cada tubo de amplificación, evitando el arrastre de burbujas.
- Se cerraron bien cada uno de los tubos.
- Antes de colocar los tubos en el rotor, se procedió a invertir la placa con un brusco movimiento, verificando que el contenido del vial sea observable en la tapa.
- Se colocaron cada uno de los tubos de amplificación en el carrusel (rotor) a partir del número 1.
- Todo el proceso realizado con las muestras se realizó también con el control positivo y negativo. Por tanto, cada conjunto de muestras procesadas simultáneamente o en una corrida, se registró en su reporte junto con los resultados de la cepa control.
- Se operó el equipo (GDS- Rotor Gene Assurance) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Una vez terminada la corrida, se retiraron los viales y se eliminaron sin abrirlos para evitar la contaminación con productos de la amplificación. Se procedió a realizar la **Descarga del GDS Rotor-Gene Assurance:**

- Se removió el rotor sin quitar el anillo de bloqueo. Se presionó el botón que se encuentra en el centro del área del Rotor para liberarlo.
- Una vez retirado el rotor del equipo se removió el anillo de bloqueo. Se prosiguió a invertirlo, se liberaron los tubos de amplificación presionando el fondo de los mismos hacia abajo, sobre un depósito con suficiente solución de hipoclorito de sodio (1.2 -2.0) % para cubrirlos.

#### 4.3.2.3 Resultados e interpretación




Existen tres posibles opciones de resultados: Positivo, negativo y no amplificado.

Positivo: La muestra es positiva presuntiva a *Salmonella*. Debe confirmarse.

Negativo: La muestra es negativa a *Salmonella*.

No amplificado: No ocurrió la amplificación. La muestra debe volver a analizarse a partir del agua peptonada incubada.

**Tabla No.4.** Interpretación de resultados del Rotor Gene

No.	Color	Name	Result	Description	Kit Lot Number
1		Sample 1	Positive	Salmonella	1234567
2		Sample 2	Negative	Salmonella	1234567
3		Sample 3	No Amp	Salmonella	1234567

Los reportes entregados por el equipo se respaldaron en formato digital y en forma impresa para ser archivados.

Cuando las muestras a evaluar, posean

#### 4.3.2.4 Confirmación de los resultados presuntivos positivos.

Se siguió el procedimiento a partir de la muestra en AP1% como lo indica el método convencional, para las fases de: Enriquecimiento en Caldo Selectivo (excepto por la modificativa del caldo MKTTn al cual se le agrega novobiocina)

Aislamiento e identificación, confirmación bioquímica.

De acuerdo a resultados se indicaron como: Presencia o Ausencia de *Salmonella spp*/25 g.

#### **4.3.2.5 Control de calidad**

- **Control Positivo**

Se realizó una vez al día cuando se efectuaba la prueba, utilizando como control positivo la cepa de *Salmonella* ATCC 14028. Se obtuvieron resultados positivos en el Assurance GDS.

- **Control Negativo**

Se realizó una vez al día cuando se efectuaba la prueba, utilizando como control positivo la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Se obtuvieron resultados negativos en el Assurance GDS.

#### **4.3.3 Inmunoensayo enzimático:**

**Metodología para la detección de *Salmonella spp.* en alimentos (Inmunoensayo colorimétrico de enzima policlonal). Método AOAC Official Method 998.09, 17.9.24.**

##### **4.3.3.1 Preparación de la muestra y pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo:**

- Se pesaron asépticamente 25 g de muestra y fueron mezclados con 225 mL de Agua peptonada 1%.
- Se homogenizó la mezcla en Stomacher por 30 segundos y se incubó a (35-37) °C por 18 h-24 h.

##### **4.3.3.2 Enriquecimiento en medio líquido selectivo.**

La muestra obtenida en la etapa anterior, se inoculó en los siguientes medios líquidos:

- Se transfirieron 0.1 mL del cultivo obtenido del pre-enriquecimiento a un tubo con 10 mL de CRV y se incubó a  $42^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ . Se agitó con Vortex.
- Se transfirió 1 mL del cultivo obtenido del pre-enriquecimiento a un tubo con 10 mL de MKTTn previamente enriquecido con 100  $\mu\text{L}$  de solución verde brillante 0.1 % y 200  $\mu\text{L}$  de solución yodo/yoduro.
- Se incubó a  $43^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ , luego, se mezcló en agitador Vortex.

#### **4.3.3.3 Post- enriquecimiento:**

- Luego del período de incubación, se tomó 1 mL del cultivo en caldo RappaportVassiliadis y se transfirió a un tubo con 10 mL de Caldo M.
- A partir del cultivo en caldo Tetratonatose tomó 1 mL y se transfirió a un tubo con 10 mL de Caldo M.
- Se incubaron los caldos M inoculados a  $(35-37)^{\circ}\text{C}$  por  $(16-20) \text{ h}$ .

#### **4.3.3.4 Desarrollo del inmunoensayo**

Se prepararon los siguientes reactivos antes de comenzar el análisis:

- Solución de lavado: Dilución del concentrado de lavado (25mL/vial) en 2 L de agua destilada.
- Control positivo: Se reconstituyó transfiriendo 3 mL del diluyente del control al control positivo liofilizado. Se mezcló vigorosamente.
- Control negativo: Se utilizó el diluyente del control.
- Set de conjugado: Se reconstituyó adicionando el diluyente del conjugado al conjugado liofilizado.
- Substrato: Se reconstituyó adicionando el diluyente del substrato al substrato liofilizado.



**Tratamiento térmico:** Se transfirieron 0.5 mL de cada uno de los enriquecimientos en Caldo M (para un volumen de 1 mL en total) a un tubo de (13 x 100) mm con tapón de rosca.

- Se calentaron en baño con agua hirviendo por (10-15) min. Luego, se enfriaron las muestra a (25-37)°C.
- Se colocaron en el soporte para pocillos del kit, el número de pocillos necesarios para el análisis de muestras (utilizando 1 pocillo por muestra, 1 pocillo para el control positivo y 1 pocillo para el control negativo).
- Utilizando una nueva punta de pipeta para cada muestra, se pipetearon 0.2 mL de cada muestra hervida dentro de pocillos individuales y se transfirieron 0.2 mL del control negativo y 0.2 mL del control positivo reconstituidos dentro de otros dos pocillos, cubriéndolos con papel parafilm para evitar evaporación. Se incubaron 30 min a (35-37) °C.
- Primer lavado: Se procedió a invertir rápidamente las cavidades para eliminar el contenido de los pocillos. Y se golpeó con firmeza el soporte varias veces boca abajo sobre una pila gruesa de toallitas de papel absorbentes. Con la solución de lavado, se rellenó completamente cada pocillo teniendo cuidado de no atrapar burbujas de aire en el fondo de cada botella. Este proceso de lavado y vaciade los pocillos se repitió un total de 3 veces.
- Adición del conjugado: Se añadieron 200 µL de conjugado a cada cavidad o pocillo vacío. Luego de agregado el conjugado se cubrieron los pocillos para evitar evaporación y se incubaron durante 30 min a (36±1) °C.
- Segundo lavado: Se lavaron los pocillos como indica el proceso en el “Primer lavado” con la diferencia que el procedimiento se repitió 4 veces.
- Adición del substrato: Se añadieron 200µL de substrato a cada pocillo vacío y se incubaron por un lapso de 15 min a (20-25) °C.

- Comprobar el color de los pocillos: Después de 15 minutos, se golpeó suavemente el soporte para lograr la distribución del color de forma uniforme antes de la lectura del resultado. El control positivo debía ser al menos tan oscuro como #4 en la “Color Card 2”.

#### **4.3.3.5 Interpretación de resultados:**

- Se procedió a comparar el color de cada pocillo o cavidad con la “Color Card 2”.
- Una muestra es considerada positiva cuando los controles son válidos y la muestra tiene un color mayor o igual al color en el panel #3 de la tarjeta de color “Color card 2”.Ver anexo VI.

#### **4.3.3.6 Confirmación de los resultados presuntivos positivos**

Los resultados positivos se confirmaron por estriado del cultivo proveniente de los Caldos RV, Caldo TT, Caldo M, en Agar HE, XLD y BS. Y las colonias típicas o sospechosas obtenidas, fueron confirmadas según el método convencional.

De acuerdo a resultados obtenidos se indicó Presencia o Ausencia de *Salmonella*/25 g.

#### **4.3.3.7 Control de calidad**

- **Control Positivo**

Se realizó una vez al día durante la ejecución de la prueba, para ello, se inoculó como control positivo la cepa de *Salmonella* ATCC 14028y se procedió de la misma manera que la muestra. Criterio de aceptación: color mayor o igual al color en el panel #3 de la tarjeta de color “Color card 2”.

- **Control Negativo**

Se realizó una vez al día cuando se efectuaba la prueba, utilizando como

control positivo la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Criterio de aceptación: color menor o igual al color en el panel #2 de la tarjeta de color "Color card 2".

#### **4.4 Preparación de controles de calidad.**

##### **4.4.1 Preparación de control positivo.**

Se retiró del congelador un criovial con la cepa de trabajo de *Salmonella* ATCC 14028, se estirió en placas de TSA para obtener colonias aisladas. Utilizando una pipeta Pasteur se extrajeron colonias bien aisladas y se preparó una suspensión bacteriana homogeneizando cuidadosamente las bacterias en un tubo con tapón de rosca conteniendo aproximadamente 10 mL de solución salina al 0.85%. Para preparar una suspensión bacteriana de  $10^8$  en la escala de McFarland, se realizó la medición en un Espectrofotómetro UV/VIS, a una longitud de onda de 625 nm. Se realizaron 5 lecturas de cada inóculo preparado para corroborar que la Absorbancia estuviese en el rango de 0.08-1.0, que es el equivalente a una concentración de  $10^8$  bacterias/mL.

A partir de la preparación del inóculo de  $10^8$ , se prepararon diluciones en solución salina al 0.85 % hasta llegar a la concentración esperada de la dilución madre (ver Anexo VII), la cual se mantenía refrigerada por una semana y a partir de ella se tomaban las alícuotas necesarias para los controles positivos durante cada prueba.

##### **4.4.2 Preparación de control negativo.**

Se retiró del congelador un criovial con la cepa de trabajo *Escherichia coli* ATCC 25922 y se agregó el contenido del mismo a un frasco con 90 mL de solución salina (Solución madre). Esta solución se mantenía refrigerada por una semana y cada vez que se realizaba la siembra de muestras, a partir de dicho frasco se tomaban 10 mL y se transferían a 90 mL del caldo de pre enriquecimiento (Agua peptonada 1%), este caldo se incubó como lo indicaba el procedimiento respectivo para *Salmonella*.

#### 4.5 Método de procesamiento de datos y análisis.

El análisis estadístico de los datos crudos obtenidos se realizó mediante el programa Excel 2010, donde utilizando como guía los parámetros establecidos en la ISO 16140:2003 se calculó la Exactitud Relativa, Sensibilidad, Especificidad, Tasa de falsos positivos, Tasa de falsos negativos.<sup>(5)</sup>

##### 4.5.1 Caracterización de parámetros de estudio

Para caracterizar los resultados obtenidos y con ello designar los parámetros requeridos, se hizo uso de la tabla de concordancias 2x2, que presenta el estándar ISO 16140:2003, lo cual se ilustra en la tabla No. 5.

**Tabla No.5** Resultados apareados de la referencia y el método alternativo.

Respuestas	Método de Referencia positivo (R+)	Método de Referencia negativo (R-)
Método alternativo positivo (A+)	+/+ Positivo Verdadero (VP)	+/- Desviación Positiva o Falso Positivo: FP, (A+/R-)
Método alternativo negativo (A-)	-/+ Desviación Negativa o Falso Negativo: FN, (A-/R+)	-/- Negativo Verdadero (VN)

Habiendo caracterizado los resultados, se realizaron los cálculos respectivos, siguiendo las fórmulas siguientes:

*Exactitud Relativa*

$$= \frac{\text{Positivos Verdaderos}(VP) + \text{Negativos Verdaderos}(VN)}{N^{\circ} \text{ total de muestras}} * 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Negativos Verdaderos}(VN)}{\text{Verdaderos Negativos}(VN) + \text{Falsos Positivos}(FP)} * 100$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Positivos Verdaderos}(VP)}{\text{Positivos Verdaderos}(VP) + \text{Falsos Negativos}(FN)} * 100$$

*Tasa de Falsos Positivos*

$$= \frac{\text{Falsos Positivos}(FP)}{\text{Falsos Positivos}(FP) + \text{Negativos Verdaderos}(VN)}$$

*Tasa de Falsos Negativos*

$$= \frac{\text{Falsos Negativos}(FN)}{\text{Falsos Negativos}(FN) + \text{Positivos Verdaderos}(VP)}$$

#### **4.5.2 Análisis de datos discrepantes**

Mediante lo establecido en el estándar ISO 16140:2003, se realizó el análisis de los datos discrepantes, para evaluar, si los métodos son comparables entre sí.

Para este fin, hicimos uso de la ecuación:

$$Y = PD + ND$$

Donde

**PD**, están representadas por las desviaciones positivas o Falsos Positivos

**ND**, lo constituyen, las desviaciones negativas, o Falsos Negativos

Para su aplicación, se realizó el recuento para cada método evaluado del número de falsos positivos y falsos negativos obtenidos.

A partir del valor de Y resultante, se comparó con lo establecido en la referencia. Donde:

-Si  $Y < 6$ , no hay prueba disponible, no hay diferencias significativas entre métodos.

-Si  $6 \leq Y \leq 22$ , (es decir, entre 6 y 22 desacuerdos), se asigna "m" como el más pequeño de los dos valores de PD y ND y se usa la ley binomial de acuerdo con la tabla No. 6 siguiente:

**Tabla No. 6** Valores de M para Y discrepancias ( $6 \leq Y \leq 22$ )

Discrepancias Y = PD + ND	6 a 8	9 a 11	12 a 14	15 a 16	17 a 19	20 a 22
M=Max(m) para $\alpha < 0.05$	0	1	2	3	4	5

Al procesar los resultados si  $m \leq M$  para un Y dado, los dos métodos son diferentes, con un  $p < 0,05$ .

Según ISO 16140:2003, para  $Y > 22$ , (más de 22 desacuerdos), utilice la prueba de McNemar con la distribución de chi-cuadrado.

#### 4.5.3 Diferencias significativas mediante Chi cuadrado McNemar

Para determinar si existían diferencias significativas entre los métodos alternativos evaluados y el Método convencional, se siguieron también las pautas que considera AOAC, donde se utilizó la prueba de McNemar (una prueba de Chi cuadrado  $\chi^2$ ), la cual establece que la proporción de positivos confirmados por el método alternativo no debe ser estadísticamente diferente de la proporción de positivos confirmados por el método de referencia.

Chi cuadrado, como se define por McNemar, es 
$$\chi^2 = \frac{(|a - b| - 1)^2}{a + b}$$

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS**

## **5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS**

A continuación se presentan los datos resultantes, luego de la evaluación de cada una de las muestras por los métodos evaluados.

### **5.1 Método convencional o de referencia**

La carne fresca de pollo, constituye una matriz de alta complejidad, ya que posee una gran cantidad de flora acompañante e interferente para su aislamiento, siguiendo técnicas convencionales de cultivo, lo cual obliga a la utilización de herramientas que provean la inhibición de dichos microorganismos, que incluyen un control efectivo de las temperaturas y los tiempos de incubación, con el fin de proveer las condiciones apropiadas para obtener células viables de dicho patógeno, ya que dadas sus características metabólicas, es considerado un mal competidor, frente a otras enterobacterias, propias de la matriz en estudio. Para el análisis de las muestras evaluadas, se siguieron las pautas citadas en el método horizontal para la detección de *Salmonella spp.* (ISO 6579:2002, IDT). Cuyos resultados se presentan en la tabla No. 7.



**Tabla No. 7** Resultados obtenidos mediante el método convencional.

Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS Método convencional	Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS Método convencional
1	1P	1	24	12P	1
2	1M	0	25	13P	0
3	2P	1	26	13M	0
4	2M	0	27	14P	0
5	3P	1	28	14M	0
6	3M	1	29	15P	0
7	4P	1	30	15M	1
8	4M	1	31	16P	1
9	5P	1	32	16M	1
10	5M	1	33	17P	0
11	6P	0	34	17M	1
12	6M	0	35	18P	0
13	7P	1	36	18M	1
14	7M	0	37	19P	1
15	8P	1	38	19M	1
16	8M	1	39	20P	0
17	9M	0	40	20M	1
18	9P	0	41	21P	1
19	10M	1	42	21M	1
20	10P	0	43	22P	1
21	11P	1	44	22M	1
22	11M	1	45	23P	0
23	12M	1	46	23M	0

1 = Presencia, 0 = Ausencia

Continuación Tabla No. 7

Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS Método convencional
47	24P	0
48	24M	1
49	25P	0
50	26P	1
51	27P	0
52	28P	0
53	25M	1
54	26M	1
55	27M	0
56	28M	1
57	29P	1
58	29M	0
59	30P	1
60	31P	1
61	32P	1
62	30M	1
63	31M	0
64	32M	0
65	33P	0
66	33M	1
67	34P	1
68	34M	0
69	35P	1
70	35M	1
71	36P	0

Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS Método convencional
72	36M	0
73	37P	0
74	37M	0
75	38P	1
76	38M	1
77	39P	1
78	39M	1
79	40P	1
80	40M	1
81	41P	0
82	41M	1
83	42P	1
84	42M	1
85	43P	1
86	43M	0
87	44P	1
88	44M	0
89	45P	1
90	45M	0
91	46P	0
92	46M	1
93	47P	1
94	47M	1
95	48P	1
96	48M	1

1 = Presencia, 0 = Ausencia.

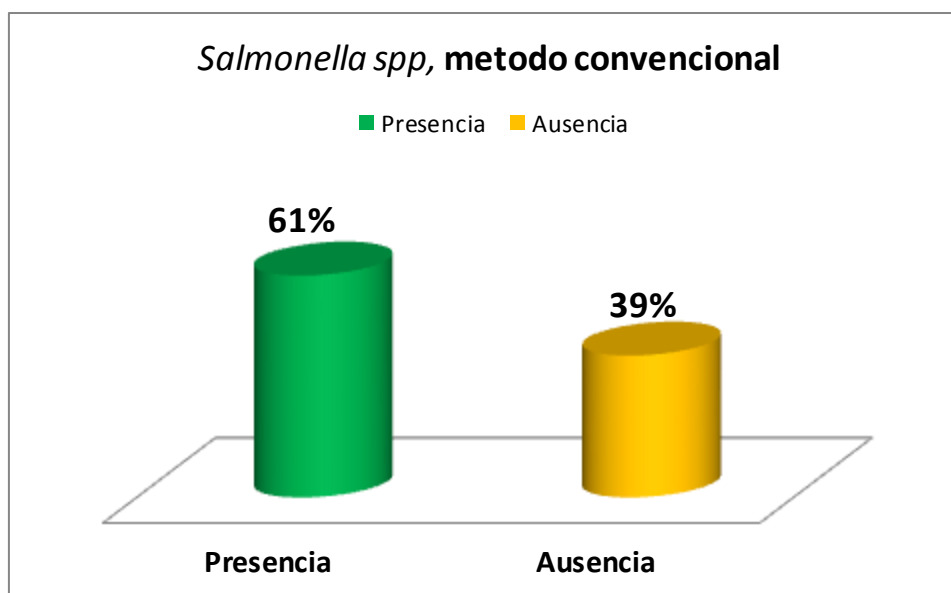
Para detallar los resultados obtenidos en la tabla No. 7, se asignó el número 1 a “presencia”, y el número 0 a “ausencia”, especificación que se mantiene a lo largo del documento.

Atribuir el resultado “presencia” a cada una de las muestras positivas, o “ausencia” a cada muestra negativa al patógeno en estudio, requirió de un exhaustivo procedimiento analítico, tal como se indicó en el apartado 4.3 correspondiente a método convencional. Ver anexo No. 15.

Para poder evaluar con mayor detalle los resultados anteriormente presentados, en la tabla No. 8 y Figura No. 5, se muestra el resumen del comportamiento de las muestras utilizando el método convencional.

**Tabla No. 8.** Resumen de resultado obtenidos mediante el método convencional.

<i>Salmonella spp</i>	No. de muestras	Porcentaje
Presencia	59	61%
Ausencia	37	39%
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>100%</b>



**Figura No. 5** Comportamiento de las muestras mediante método convencional.

En la Figura No. 5, se detalla el porcentaje de positividad obtenido, mediante la utilización del método convencional, o de referencia, evidenciándose que el método fue capaz de detectar al patógeno en estudio en 59 de 96 muestras, lo que equivale a un 61% de positividad, siendo por tanto, una demostración experimental que el microorganismo *Salmonella*, puede encontrarse en la carne fresca de pollo, siendo este un reservorio adecuado para su crecimiento y multiplicación.

Se pone de manifiesto además, la idoneidad del método convencional, ya que, aún en presencia de múltiple flora propia de la matriz en estudio, el método es capaz de detectar a *Salmonella*.

Los inconvenientes que presenta el método convencional, están relacionados con el tiempo que conlleva la realización del mismo, e implica además la utilización de múltiples medios de cultivo, insumos y reactivos, lo que hace más lenta la respuesta al análisis, y por tanto la aplicación de las medidas correctivas pertinentes, para evitar la proliferación del microorganismo que es un patógeno importante desde el punto de vista de salud pública.

Para observar las características de las colonias aisladas a partir de las muestras y los resultados a las pruebas bioquímicas realizadas para su identificación. Ver anexos No.9, 10 y 11.

## 5.2 Resultados obtenidos por el método Assurance GDS System

Los datos obtenidos a partir del método molecular Assurance GDS System se presentan en la tabla No. 9

**Tabla No.9** Resultados obtenidos mediante el método Assurance GDS System

Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS	
		Método alternativo 1 GDS	
		Presuntivos	Confirmados
1	1P	1	1
2	1M	0	0
3	2P	1	1
4	2M	0	0
5	3P	1	1
6	3M	1	0
7	4P	1	0
8	4M	1	1
9	5P	1	1
10	5M	1	1
11	6P	0	1
12	6M	0	1
13	7P	1	0
14	7M	0	0
15	8P	1	1
16	8M	1	1
17	9M	0	0
18	9P	0	0
19	10M	1	1
20	10P	0	0
21	11P	1	1
22	11M	1	1
23	12M	1	1
24	12P	1	1

1 = Presencia, 0 = Ausencia

Continuación Tabla No. 9

Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS	
		Método alternativo 1 GDS	
		Presuntivos	Confirmados
25	13P	0	0
26	13M	0	0
27	14P	0	0
28	14M	0	0
29	15P	0	0
30	15M	1	1
31	16P	1	1
32	16M	1	1
33	17P	0	0
34	17M	1	1
35	18P	0	1
36	18M	1	1
37	19P	1	0
38	19M	1	0
39	20P	0	0
40	20M	1	1
41	21P	1	0
42	21M	1	1
43	22P	1	1
44	22M	1	1
45	23P	0	0
46	23M	0	1
47	24P	0	0
48	24M	1	1

1 = Presencia, 0 = Ausencia

Continuación Tabla No. 9

Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS	
		Método alternativo 1 GDS	
		Presuntivos	Confirmados
49	25P	1	0
50	26P	1	1
51	27P	0	0
52	28P	0	0
53	25M	1	1
54	26M	1	1
55	27M	1	0
56	28M	1	1
57	29P	1	1
58	29M	0	0
59	30P	1	1
60	31P	1	1
61	32P	1	1
62	30M	1	1
63	31M	0	0
64	32M	0	0
65	33P	0	0
66	33M	1	1
67	34P	1	1
68	34M	0	0
69	35P	1	1
70	35M	1	1
71	36P	0	0
72	36M	0	0

1 = Presencia, 0 = Ausencia

Continuación Tabla No. 9

Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS	
		Método alternativo 1 GDS	
		Presuntivos	Confirmados
73	37P	0	0
74	37M	1	0
75	38P	1	1
76	38M	1	1
77	39P	1	1
78	39M	1	1
79	40P	1	1
80	40M	1	1
81	41P	0	0
82	41M	1	1
83	42P	1	1
84	42M	1	1
85	43P	1	1
86	43M	0	0
87	44P	0	1
88	44M	0	0
89	45P	0	1
90	45M	0	0
91	46P	0	0
92	46M	1	1
93	47P	1	1
94	47M	1	1
95	48P	0	1
96	48M	1	1

1 = Presencia, 0 = Ausencia

Tomando en cuenta que las muestras cuyo resultado es positivo por GDS, son consideradas presuntivos, debido a que deben confirmarse mediante el método convencional, los resultados que se obtienen nos brindan un panorama general en un corto tiempo, para tomar decisiones y aplicar medidas oportunamente. De ahí que entre presuntivos y confirmados existan diferencias. El detalle de los

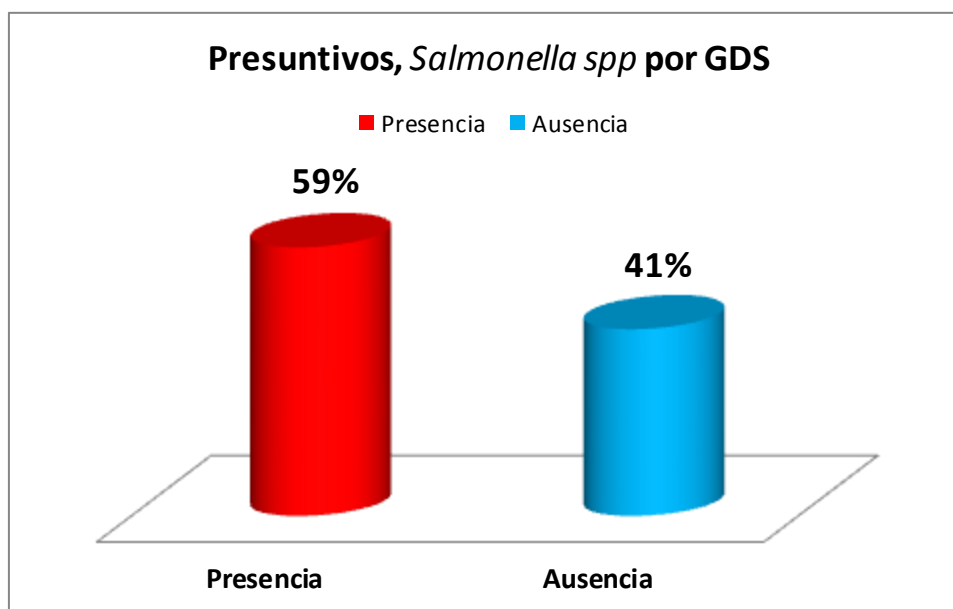


resultados emitidos por el software respectivo, pueden verificarse en el Anexo No.13

El resumen de los resultados obtenidos mediante la utilización del método molecular Assurance GDS System, se encuentra en la tabla No. 10.

**Tabla No. 10** Resumen de resultados presuntivos obtenidos mediante el método Assurance GDS System

<i>Salmonella spp</i>	No. de muestras	Porcentaje
Presencia	57	59%
Ausencia	39	41%
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>100%</b>



**Figura No. 6** Comportamiento de las muestras mediante el método Assurance GDS System.

De las 96 muestras procesadas, el método molecular Assurance GDS System, muestra un porcentaje de positividad del 59%, es decir 57 de 96 muestras dieron resultado positivo al patógeno en estudio; mientras que el 41% restante,

equivalente a 39 de 96 muestras, resultaron ser negativas a *Salmonella* de manera presuntiva. Todo esto es presentado en la tabla No. 10 y Figura No.6.

Cabe destacar que los porcentajes anteriormente mencionados, se encuentran muy cercanos a los establecidos para el método convencional según puede verificarse en la tabla No. 8 y Fig. No.5 Pero es hasta el momento de individualizar cada muestra por cada uno de los métodos que se podrá concluir al respecto.

Utilizando las herramientas tecnológicas que se encuentran actualmente en el ámbito analítico, podemos emitir respuestas frente a situaciones que obligan a emitir resultados rápidos, por lo que, hacer énfasis en la idoneidad de los métodos de ensayo, es fundamental.

El método Assurance GDS System, resulta preliminarmente muy cercano a su referencia, el método convencional, en cuanto a la posibilidad de que un resultado presuntivo, se convierta a un resultado confirmado. Las variantes que se presenten, son los elementos que determinan los valores que tomaran los parámetros de desempeño del método, y la definición de la existencia o no de diferencias significativas entre los métodos evaluados.

### 5.3 Resultados obtenidos por el método de inmunoensayo VIA TECRA

Los datos obtenidos a partir del método de inmunoensayo VIA TECRA se presentan en la tabla No. 11.

**Tabla No. 11** Resultados obtenidos por método VIA TECRA

Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS	
		Método alternativo 2 VIA TECRA	
		Presuntivos	Confirmados
1	1P	1	1
2	1M	0	0
3	2P	1	1
4	2M	0	0
5	3P	1	1
6	3M	0	1
7	4P	1	1
8	4M	1	1
9	5P	1	1
10	5M	1	1
11	6P	0	0
12	6M	1	0
13	7P	1	1
14	7M	0	0
15	8P	1	1
16	8M	1	1
17	9M	0	0
18	9P	0	0
19	10M	1	1
20	10P	0	0
21	11P	1	1
22	11M	1	1
23	12M	1	1
24	12P	1	1

1 = Presencia, 0 = Ausencia

Continuación Tabla No. 11

Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS	
		Método alternativo 2 VIATECRA	
		Presuntivos	Confirmados
25	13P	0	0
26	13M	0	0
27	14P	0	0
28	14M	0	0
29	15P	0	0
30	15M	1	1
31	16P	1	1
32	16M	1	1
33	17P	0	0
34	17M	1	1
35	18P	1	0
36	18M	1	1
37	19P	1	1
38	19M	1	1
39	20P	0	0
40	20M	1	1
41	21P	1	1
42	21M	1	1
43	22P	1	1
44	22M	1	1
45	23P	0	0
46	23M	1	0
47	24P	0	0
48	24M	1	1

1 = Presencia, 0 = Ausencia

Continuación Tabla No. 11

Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS	
		Método alternativo 2 TECRA	
		Presuntivos	Confirmados
49	25P	0	0
50	26P	1	1
51	27P	0	0
52	28P	0	0
53	25M	1	1
54	26M	1	1
55	27M	0	0
56	28M	0	1
57	29P	1	1
58	29M	0	0
59	30P	1	1
60	31P	1	1
61	32P	1	1
62	30M	0	1
63	31M	0	0
64	32M	0	0
65	33P	0	0
66	33M	1	1
67	34P	1	1
68	34M	0	0
69	35P	1	1
70	35M	1	1
71	36P	0	0
72	36M	0	0

1 = Presencia, 0 = Ausencia

Continuación Tabla No. 11

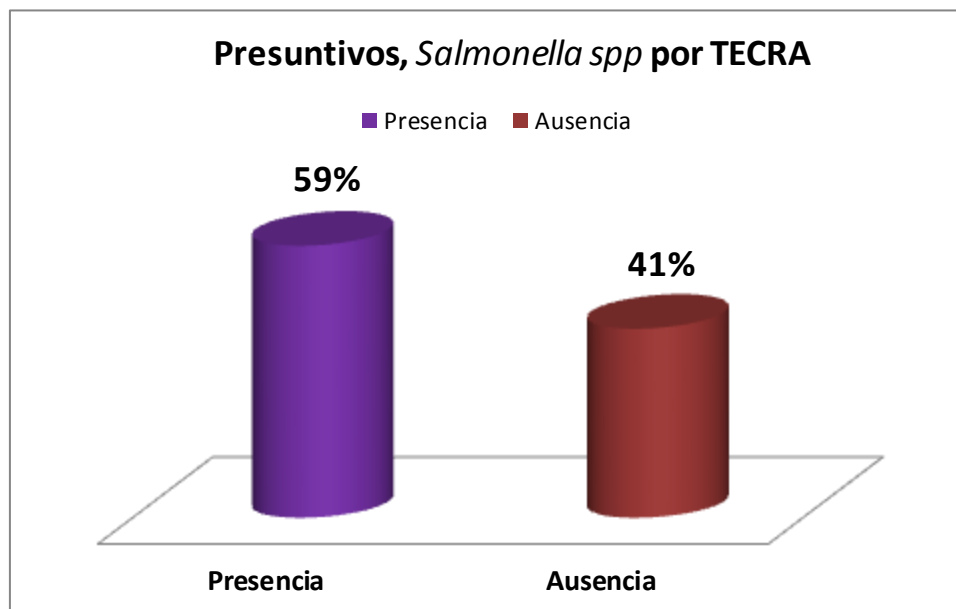
Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS	
		Método alternativo 2 TECRA	
		Presuntivos	Confirmados
73	37P	0	0
74	37M	1	0
75	38P	1	1
76	38M	1	1
77	39P	1	1
78	39M	1	1
79	40P	1	1
80	40M	1	1
81	41P	0	0
82	41M	1	1
83	42P	1	1
84	42M	0	1
85	43P	0	1
86	43M	1	0
87	44P	0	1
88	44M	0	0
89	45P	1	1
90	45M	0	0
91	46P	0	0
92	46M	0	1
93	47P	1	1
94	47M	1	1
95	48P	1	1
96	48M	1	1

1 = Presencia, 0 = Ausencia

El resumen de los datos planteados en la tabla No. 11, se presentan en la tabla No. 12.

**Tabla No. 12** Resumen de resultados presuntivos obtenidos por el método VIA TECRA.

<i>Salmonella spp</i>	No. De muestras	Porcentaje
Presencia	57	59%
Ausencia	39	41%
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>100%</b>



**Figura No. 7** Comportamiento de las muestras mediante el método VIA TECRA

La tabla No. 12 y figura No. 7, nos ilustran respecto a los resultados presuntivos que provee el inmunoensayo, de donde, similarmente a lo detallado en lo respectivo al método Assurance GDS System (tabla No.10 y figura No. 6 ) se obtiene que, de las 96 muestras procesadas, el inmunoensayo VIA TECRA, muestra un porcentaje de positividad del 59%, es decir 57 de 96 muestras dieron resultado positivo presuntivo al patógeno en estudio; mientras que el 41% restante, equivalente a 39 de 96 muestras, resultaron ser negativas a

*Salmonella*. Se puede evidenciar que para los tres métodos en estudio, se obtuvieron porcentajes elevados presencia presuntiva de *Salmonella*, esto sugiere la implicación de la actividad de agua del alimento, y el proceso de contaminación cruzada que suele desarrollarse en las góndolas del supermercado, sin ser un elemento limitante, la ubicación geográfica y la cadena a la cual pertenece cada establecimiento muestreado.

Cabe destacar que al igual que en el caso anteriormente expuesto respecto a los resultados del método Assurance GDS System, el inmunoensayo VIA TECRA, emite respuestas o resultados presuntivos, que deben confirmarse mediante el método convencional. Por ello algunas muestras difieren en su resultado presuntivo y el confirmado. Lo que da lugar al cálculo de los parámetros de desempeño del método; Exactitud Relativa, Sensibilidad, Especificidad, Tasa de Falsos Positivos, Tasa de Falsos Negativos, análisis de datos discrepantes y Chi cuadrado de McNemar, los cuales serán detallados a continuación.

#### **5.4 Comparación de los métodos en estudio**

Recordando los objetivos del presente estudio, en este apartado se presentan los resultados obtenidos de cada una de las 96 muestras de carne fresca de pollo, analizadas en simultáneo por los 3 métodos de interés: método molecular Assurance GDS System, método VIA TECRA y el método convencional (ISO 6579) considerado la referencia, y por el cual deben confirmarse las muestras que resultaren positivas en los métodos screening anteriormente mencionados.

En la tabla No. 13, se presenta la totalidad de muestras analizadas y sus correspondientes resultados por los métodos utilizados, además de adicionarse una columna de “interpretación”, donde se caracterizan los resultados partiendo de la tabla de contingencia 2x2, que se presentó en la tabla No. 5, del apartado de metodología en el numeral 4.5.1, donde se considera que:



Se establece como Verdadero Positivo (VP), las muestras cuyo resultado presuntivo positivo, coincide con el resultado positivo que se ha confirmado, siguiendo el método convencional.

Un Verdadero Negativo (VN), está constituido por un resultado negativo, tanto en el método screening evaluado, como mediante técnicas convencionales.

Un Falso Positivo (FP), es aquel donde se ha obtenido un resultado positivo presuntivo, mediante los métodos screening, pero que no se ha podido confirmar siguiendo el método de referencia, es decir, los métodos alternativos aportan una respuesta positiva a la detección del patógeno, pero para el método convencional es un resultado negativo.

Un Falso Negativo (FN), es atribuible a las muestras cuyo resultado presuntivo generado por los métodos screening es negativo, que evoca “ausencia”, mientras que siguiendo el método convencional se logra el aislamiento del patógeno, es decir; “presencia”.

Obtener la menor cantidad de falsos positivos y falsos negativos, es uno de los principales retos de quienes desarrollan métodos alternativos de análisis microbiológico, debido a que, tanto el emitir un falso positivo de un patógeno, que implicaría por ejemplo, el destruir un lote completo de un producto, suspender una licencia de funcionamiento, perder una cuantiosa demanda, etc. Es decir generar altas pérdidas por considerar un producto contaminado con un determinado microorganismo.

Por otro lado, emitir un falso negativo, desencadenaría una gran problemática sanitaria, ya que, por ejemplo, se liberarían lotes de productos, al creer que están libres de patógenos, poniendo así en riesgo a la población tras su consumo, se entorpecería el proceso de investigación de brotes, al descartar al patógeno como agente causal, etc.

Por lo tanto, los determinantes anteriormente descritos, nos brindan la oportunidad de evaluar a los métodos, ya que la búsqueda de métodos alternativos confiables, cuyas tasas de falsos positivos y falsos negativos sean

lo más insignificante posible, es una de las principales características para generar confianza, y tomar con seriedad los resultados presuntivos que se obtienen de estos métodos.

Para verificar el comportamiento de cada una de las muestras analizadas, la tabla No. 13, nos presenta el detalle de las mismas, con su correspondiente interpretación, según lo anteriormente planteado.

Para realizar dicha interpretación, se creó en Excel 2010 una función tipo “prueba lógica”, que provee la posibilidad de condicionar un atributo. Para verificar dichas funciones ver Anexo No.14.

**Tabla No. 13** Resultados generales de la comparación de los métodos.

Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS					INTERPRETACION	
		Método de Referencia	Método alternativo 1 GDS		Método alternativo 2 TECRA		Método alternativo 1 GDS	Método alternativo 2 TECRA
			Presuntivos	Confirmados	Presuntivos	Confirmados		
1	1P	1	1	1	1	1	VP	VP
2	1M	0	0	0	0	0	VN	VN
3	2P	1	1	1	1	1	VP	VP
4	2M	0	0	0	0	0	VN	VN
5	3P	1	1	1	1	1	VP	VP
6	3M	1	0	1	0	1	FN	FN
7	4P	1	0	1	1	1	FN	VP
8	4M	1	1	1	1	1	VP	VP
9	5P	1	1	1	1	1	VP	VP
10	5M	1	1	1	1	1	VP	VP
11	6P	0	1	0	0	0	FP	VN
12	6M	0	1	0	1	0	FP	FP
13	7P	1	0	1	1	1	FN	VP
14	7M	0	0	0	0	0	VN	VN
15	8P	1	1	1	1	1	VP	VP
16	8M	1	1	1	1	1	VP	VP
17	9M	0	0	0	0	0	VN	VN
18	9P	0	0	0	0	0	VN	VN
19	10M	1	1	1	1	1	VP	VP
20	10P	0	0	0	0	0	VN	VN
21	11P	1	1	1	1	1	VP	VP
22	11M	1	1	1	1	1	VP	VP
23	12M	1	1	1	1	1	VP	VP
24	12P	1	1	1	1	1	VP	VP
25	13P	0	0	0	0	0	VN	VN
26	13M	0	0	0	0	0	VN	VN
27	14P	0	0	0	0	0	VN	VN
28	14M	0	0	0	0	0	VN	VN
29	15P	0	0	0	0	0	VN	VN
30	15M	1	1	1	1	1	VP	VP
31	16P	1	1	1	1	1	VP	VP
32	16M	1	1	1	1	1	VP	VP
33	17P	0	0	0	0	0	VN	VN
34	17M	1	1	1	1	1	VP	VP
35	18P	0	1	0	1	0	FP	FP
36	18M	1	1	1	1	1	VP	VP
37	19P	1	0	1	1	1	FN	VP
38	19M	1	0	1	1	1	FN	VP
39	20P	0	0	0	0	0	VN	VN
40	20M	1	1	1	1	1	VP	VP
41	21P	1	0	1	1	1	FN	VP
42	21M	1	1	1	1	1	VP	VP
43	22P	1	1	1	1	1	VP	VP
44	22M	1	1	1	1	1	VP	VP
45	23P	0	0	0	0	0	VN	VN
46	23M	0	1	0	1	0	FP	FP
47	24P	0	0	0	0	0	VN	VN
48	24M	1	1	1	1	1	VP	VP

1 = Presencia, 0 = Ausencia

Continuación Tabla No. 13

Correlativo	Muestra estudio	RESULTADOS					INTERPRETACION	
		Método de Referencia	Método alternativo 1 GDS		Método alternativo 2 TECRA		Método alternativo 1 GDS	Método alternativo 2 TECRA
			Presuntivos	Confirmados	Presuntivos	Confirmados		
49	25P	0	1	0	0	0	FP	VN
50	26P	1	1	1	1	1	VP	VP
51	27P	0	0	0	0	0	VN	VN
52	28P	0	0	0	0	0	VN	VN
53	25M	1	1	1	1	1	VP	VP
54	26M	1	1	1	1	1	VP	VP
55	27M	0	1	0	0	0	FP	VN
56	28M	1	1	1	0	1	VP	FN
57	29P	1	1	1	1	1	VP	VP
58	29M	0	0	0	0	0	VN	VN
59	30P	1	1	1	1	1	VP	VP
60	31P	1	1	1	1	1	VP	VP
61	32P	1	1	1	1	1	VP	VP
62	30M	1	1	1	0	1	VP	FN
63	31M	0	0	0	0	0	VN	VN
64	32M	0	0	0	0	0	VN	VN
65	33P	0	0	0	0	0	VN	VN
66	33M	1	1	1	1	1	VP	VP
67	34P	1	1	1	1	1	VP	VP
68	34M	0	0	0	0	0	VN	VN
69	35P	1	1	1	1	1	VP	VP
70	35M	1	1	1	1	1	VP	VP
71	36P	0	0	0	0	0	VN	VN
72	36M	0	0	0	0	0	VN	VN
73	37P	0	0	0	0	0	VN	VN
74	37M	0	1	0	1	0	FP	FP
75	38P	1	1	1	1	1	VP	VP
76	38M	1	1	1	1	1	VP	VP
77	39P	1	1	1	1	1	VP	VP
78	39M	1	1	1	1	1	VP	VP
79	40P	1	1	1	1	1	VP	VP
80	40M	1	1	1	1	1	VP	VP
81	41P	0	0	0	0	0	VN	VN
82	41M	1	1	1	1	1	VP	VP
83	42P	1	1	1	1	1	VP	VP
84	42M	1	1	1	0	1	VP	FN
85	43P	1	1	1	0	1	VP	FN
86	43M	0	0	0	1	0	VN	FP
87	44P	1	0	1	0	1	FN	FN
88	44M	0	0	0	0	0	VN	VN
89	45P	1	0	1	1	1	FN	VP
90	45M	0	0	0	0	0	VN	VN
91	46P	0	0	0	0	0	VN	VN
92	46M	1	1	1	0	1	VP	FN
93	47P	1	1	1	1	1	VP	VP
94	47M	1	1	1	1	1	VP	VP
95	48P	1	0	1	1	1	FN	VP
96	48M	1	1	1	1	1	VP	VP

1 = Presencia, 0 = Ausencia

Al realizar el recuento de cada uno de los elementos: Verdaderos positivos (VP), Verdaderos Negativos (VN), Falsos negativos (FN) y Falsos positivos (FP), presentados ampliamente en la tabla No. 13, se obtiene lo que se detalla en la tabla No. 14.

**Tabla No. 14** Recuento de elementos destacados en la comparación de métodos.

PARAMETROS	METODO EVALUADO	
	GDS	TECRA
Verdaderos Positivos (VP)	50	52
Verdaderos Negativos (VN)	30	32
Falsos Negativos (FN)	9	7
Falsos Positivos (FP)	7	5
TOTAL	<b>96</b>	<b>96</b>

La tabla No.14, nos muestra el recuento general de cada uno de los elementos que nos ayudan a evaluar los métodos Assurance GDS System e inmunoensayo VIA TECRA, contra el método de cultivo convencional, a través del cálculo de los parámetros Exactitud Relativa, Sensibilidad, Especificidad, Tasa de Falsos Positivos y Tasa de Falsos Negativos.

Preliminarmente observamos que el inmunoensayo VIA TECRA, posee mayor cantidad de Verdaderos Positivos (52) y Verdaderos Negativos (32), y una menor cantidad de Falsos Negativos (7) y Falsos Positivos (5), contra lo correspondiente al Assurance GDS System.

#### **5.4.1 Muestras presuntivas contra muestras confirmadas.**

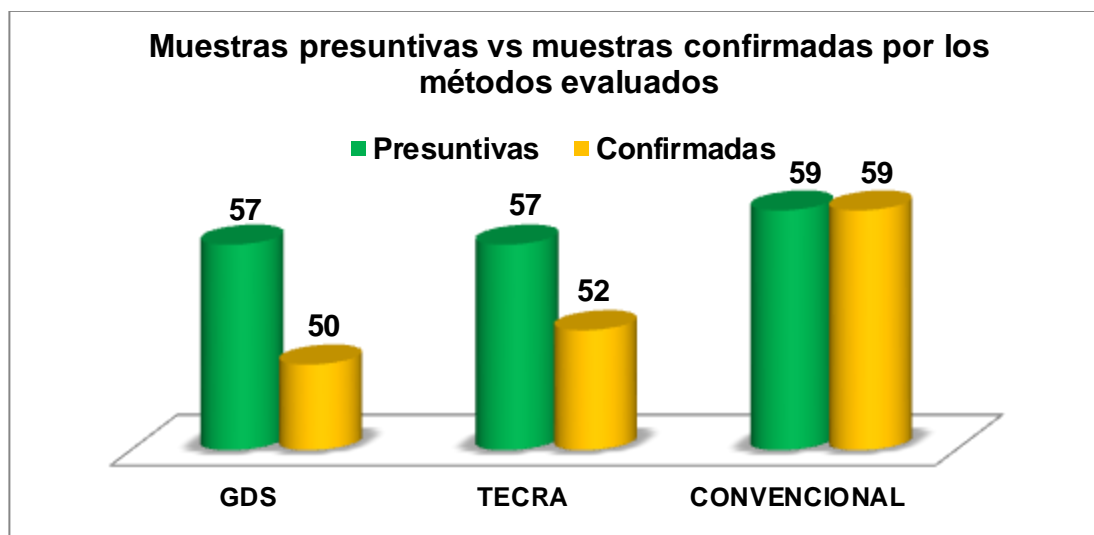
Cada uno de los resultados presuntivos, emitidos por los métodos screening evaluados (GDS Assurance y VIA TECRA) fueron sometidos al proceso de confirmación, siguiendo las pautas del método convencional de cultivo, de ahí que muchas de las muestras al ser categorizadas, cambian su condición

presuntiva de “presencia” por “ausencia” y viceversa. Y por tanto generan un cambio en la cantidad de respuestas positivas y negativas frente a cada método ensayado, habiendo por tanto, un cambio en los resultados mostrados anteriormente en la tabla No. 10 y figura No. 6, correspondientes a los resultados presuntivos emitidos por GDS Assurance y en la tabla No. 12 y figura No. 7, que pertenecen a los resultados de VIA TECRA.

El resumen y correspondiente comparación de respuestas presuntivas contra las respuestas confirmadas por los métodos evaluados se presenta en la tabla No. 15 y figura No. 8.

**Tabla No.15** Resumen de resultados presuntivos versus resultados confirmados

METODO EVALUADO	MUESTRAS POSITIVAS A <i>Salmonella</i>		PORCENTAJE DE DESVIACIÓN
	Presuntivas	Confirmadas	
GDS	57	50	12.3%
TECRA	57	52	8.8%
CONVENCIONAL	59	59	0.0%



**Figura No. 8** Muestras presuntivas versus muestras confirmadas por los métodos evaluados.

Tal y como se observa en la tabla No. 15 y Figura No. 8, no todas las respuestas positivas presuntivas emitidas por los métodos screening ensayados (GDS Assurance y VIA TECRA) se pudieron confirmar, mientras que la totalidad de las muestras asignadas como positivas por el método de cultivo convencional se confirmaron como positivas para *Salmonella*.

Observando entonces el comportamiento de los métodos, vemos que Assurance GDS en su descripción general de respuestas presuntivas positivas descritas en tabla No. 10 y Figura No. 6 mostraba 57 muestras presuntivas positivas, solo 50 de ellas pudieron ser confirmadas, quedando 7 muestras equivalentes a 12.3 %, que fueron incongruentes.

Para el caso de VIA TECRA, inicialmente, se presentaron en la tabla No. 12 y figura No. 7, 57 muestras presuntivas positivas, de las que se confirmaron un total de 52, teniendo un porcentaje de desvío de 8.8%.

Por lo tanto, dichas desviaciones generan los valores requeridos para evaluar los parámetros de desempeño considerados.

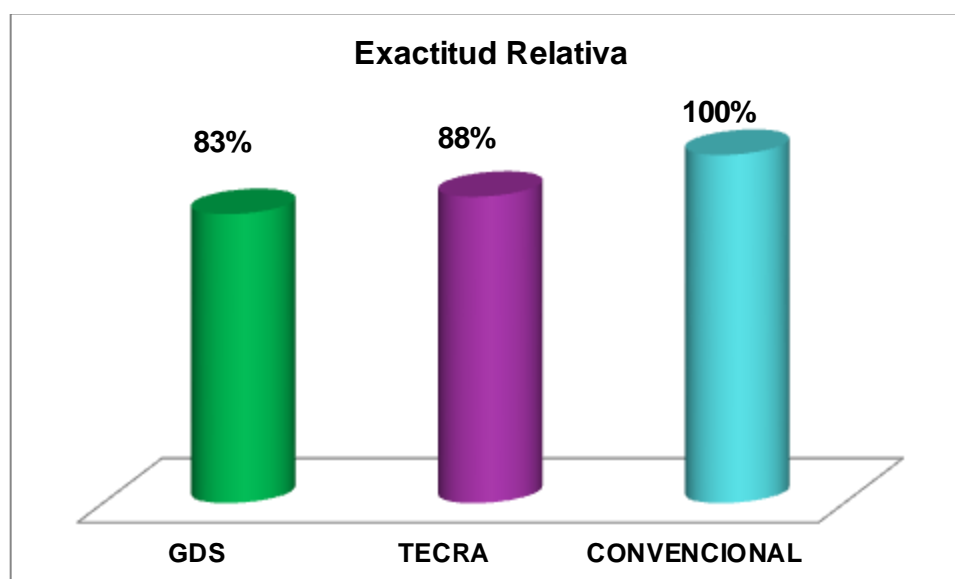
Cabe destacar que todos los resultados confirmados, fueron llevados hasta la etapa de identificación bioquímica, mediante el uso de pruebas tradicionales y kits miniaturizados de la gama API 20E. La identificación serológica que es un complemento y un apoyo para lograr identificar factores más específicos y que determinan virulencia y patogenicidad no se lograron realizar por los costos adicionales referidos a la adquisición de antisueros, que no fueron parte de la presente investigación.

#### **5.4.2 Cálculo de Exactitud Relativa**

Dado que la Exactitud Relativa mide el grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y la respuesta obtenida por el método alternativo en muestras idénticas, para nuestro caso, la tabla No. 16 y figura No. 9, nos muestra los resultados emitidos para este parámetro, por los métodos evaluados.

**Tabla No. 16** Exactitud Relativa de los métodos

Exactitud Relativa	
Método	Porcentaje
GDS	83%
TECRA	88%
CONVENCIONAL	100%

**Figura No. 9** Exactitud Relativa de los métodos evaluados.

La correspondencia entre los resultados confirmados obtenidos por el método Assurance GDS conforme el método convencional, fue del 83%, considerando el análisis de una muestra idéntica, al seguir el caso 1, que establece ISO 16140:2003, donde luego de un preenriquecimiento general, se divide la muestra para seguir cada método de ensayo según corresponda, de esta manera las respuestas de los métodos se han de comparar para evaluar la exactitud relativa.

Un 88% de concordancia con el método convencional logró VIA TECRA y con ello supera en exactitud al método molecular, en un 5%.



Ambos métodos poseen una correspondencia mayor al 80%, con respecto a la referencia.

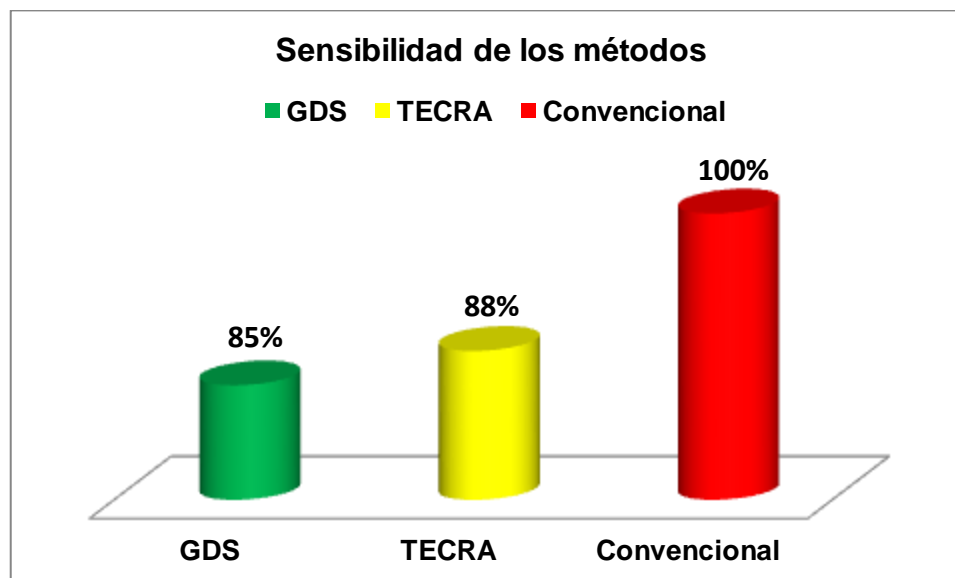
Se considera exactitud “relativa”, ya que se valora como referencia aceptada al método convencional.

#### 5.4.3 Cálculo de la Sensibilidad

Considerando que la sensibilidad es el número total de resultados positivos, correctamente asignados en el análisis presuntivo, generado por los métodos screening (Assurance GDS System y VIA TECRA), es decir, la capacidad de que poseen los métodos de detectar al microorganismo diana, cuando éste se encuentra presente, la tabla No. 17, y la figura No. 10, nos presenta, la sensibilidad calculada para los métodos en estudio. Para observar la fórmula utilizada para dicho cálculo ver Anexo No. 17.

**Tabla No. 17** Sensibilidad de los métodos

<b>Sensibilidad de los métodos</b>	
<b>Método</b>	<b>Porcentaje</b>
GDS	85%
TECRA	88%
Convencional	100%



**Figura No. 10** Sensibilidad de los métodos evaluados.

En la tabla No. 17 y figura No. 10, tenemos la evaluación del parámetro, Sensibilidad, que para efectos de comparación se establece, que el método convencional, posee el 100% de sensibilidad, es decir que posee la capacidad óptima de detectar al patógeno *Salmonella spp*, siempre y cuando éste se encuentre presente en la matriz en estudio, que para nuestro caso es la carne fresca de pollo.

El método alternativo 1, Assurance GDS System, obtuvo un 85% de sensibilidad, es decir; la capacidad que posee este método de asignar correctamente una muestra positiva, en el análisis presuntivo, corresponde a un 85%, valor que se encuentra dentro de los valores convencionalmente aceptados en microbiología, ya que proporcionan una sensibilidad mayor al 80%<sub>(27)</sub>. En algunos casos las normativas nacionales asignan arbitrariamente el valor que debe poseer este parámetro, asumiendo que el método debe tener una sensibilidad  $\geq 90\%$ <sub>(24)</sub>, y que al no cumplir dicho límite debe considerarse una validación estadísticamente adecuada, como el estudio de datos discrepantes mediante el Test McNemar (Anexo F en ISO 16140:2003).

Cabe destacar, que métodos del tipo molecular, se ven afectados por diversas características propias de la matriz, como la presencia de inhibidores, grasa propia de la muestra, etc. Lo que genera cierto nivel de interferencia al momento de realizar los análisis. Además dado que estos métodos están diseñados para detectar un segmento específico del ADN del microorganismo diana, éste será detectado, estando el microorganismo vivo o no, y los métodos convencionales solo pueden aislar células viables, que se puedan cultivar en medios específicos para tal fin, en los que se expresen las características esperadas.

Por lo que pese a que la tasa de Sensibilidad obtenida es del 85% puede darse el caso, que muestras detectadas como positivas presuntivas, no pudieron ser confirmadas por el método de cultivo convencional, porque las bacterias estaban estresadas e injuriadas, conocidas como “viables no cultivables”, pero para llegar a dicha conclusión, deben realizarse estudios específicos para tal fin, los cuales no son parte del presente estudio, pero que valdría la pena realizar a futuro.

Los métodos moleculares son la tendencia actual en la detección de patógenos, por las características anteriormente descritas, referidas a la capacidad de detectar segmentos específicos del ADN, del microorganismo diana, se encuentre éste viable o no, lo cual puede ser una herramienta importante en el estudio de brotes y epidemiología, respecto a la obtención de respuestas oportunas y fiables.

El inmunoensayo VIA TECRA, muestra una tasa de Sensibilidad, del 88%, un 3% más alta, comparado con GDS, lo que implica aparentemente una capacidad mayor, para detectar al patógeno *Salmonella*, en la carne fresca de pollo.

La naturaleza de este método se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, que se hace visible mediante la formación de un complejo coloreado, considerado

en la prueba presuntiva (ver carta de color en Anexo VI) y busca mediante la formación del sándwich propio de las pruebas ELISA, capturar los anticuerpos específicos de *Salmonella spp.*

Este tipo de métodos, ha sufrido múltiples modificaciones, para lograr acercarse más a los requerimientos metodológicos e investigativos que se exigen actualmente, con el fin de competir con los métodos moleculares, que les han desplazado en gran medida.

Los inmunoensayos, requieren condiciones sencillas de operación, y en el mercado, existen diversos kits que cumplen tal fin.

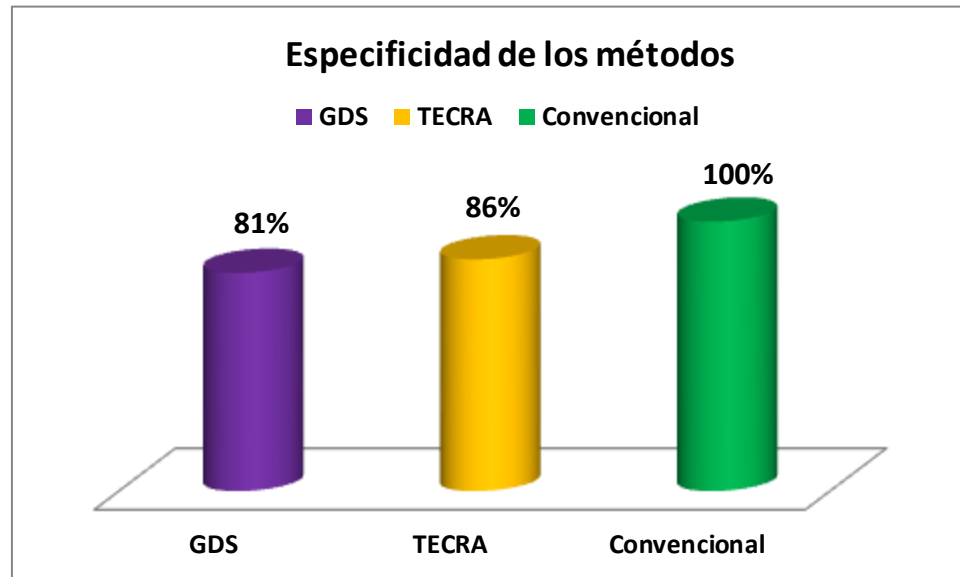
#### 5.4.4 Cálculo de Especificidad

El parámetro Especificidad, considera los resultados negativos, correctamente asignados en la prueba presuntiva; es decir, los que se expresan negativos o “0” según cada uno de los métodos evaluados.

Para revisar los resultados correspondientes a este parámetro se presentan en la tabla No. 18 y figura No. 11.

**Tabla No. 18** Especificidad de los métodos

Especificidad de los métodos	
Método	Porcentaje
GDS	81%
TECRA	86%
Convencional	100%



**Figura No. 11** Especificidad de los métodos evaluados.

Los resultados referidos a la Especificidad, nos muestran al inmunoensayo VIA TECRA con un 86%, mientras que Assurance GDS System, con un 81%, teniendo por tanto, un mejor desempeño el inmunoensayo.

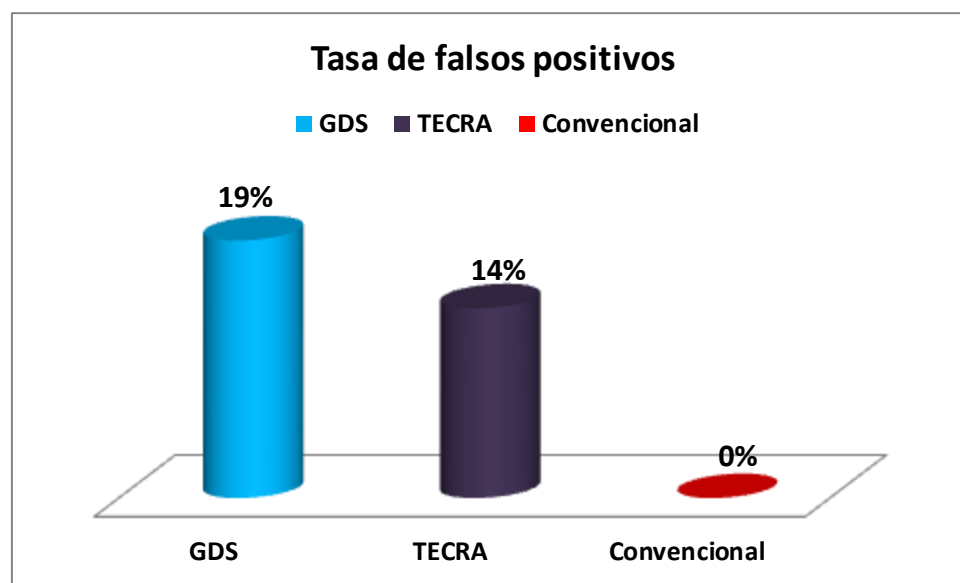
Se atribuye el 100% al método convencional, siéndo éste la referencia.

#### 5.4.5 Cálculo de Tasa de Falsos Positivos

Los falsos positivos, tal como se describió en 5.4, son aquellos que presuntivamente son positivos al patógeno, pero que no logran confirmarse por el método convencional. En otras palabras aquellos positivos obtenidos por técnicas de screening, pero que por el método convencional resultan ser negativos. Para verificar los resultados para este parámetro ver tabla No. 19 y figura No. 12.

**Tabla No. 19** Tasa de falsos positivos

Tasa de falsos positivos	
Método	Porcentaje
GDS	19%
TECRA	14%
Convencional	0%

**Figura No. 12** Tasa de Falsos Positivos de los métodos evaluados.

El método Assurance GDS System, posee una tasa de falsos positivos del 19%, y dicho valor supera a lo calculado para el inmunoensayo VIA TECRA, ya que este último resultó con un 14%.

Este parámetro nos permite estimar, en que medida el método nos provee una respuesta positiva en la etapa presuntiva, que resultó ser negativa, al confirmar por métodos convencionales de cultivo. Hecho que interviene en razón de costos, ya que estos se ven aumentados, al sugerir muestras con resultados presuntivos positivos, que deben pasar a la etapa confirmativa, donde intervienen diversas etapas hasta lograr el cultivo de células viables del patógeno considerado.

Para poder elegir un método alternativo, como herramienta eficaz de análisis, es necesario que la tasa de falsos positivos, sea lo más pequeña posible, cercana a 0% es el ideal, para garantizar así la confiabilidad del mismo.

Los valores resultantes, son mayores al 10% y menores al 20%, por lo que para poseer una mayor confianza respecto a la correspondencia entre métodos, se evalúa según el anexo F de ISO 16140:2003, lo cual se plantea en 5.4.7.

Para efectos de comparación, se asigna el 0% a la tasa de falsos positivos, al método convencional, por considerarse la referencia.

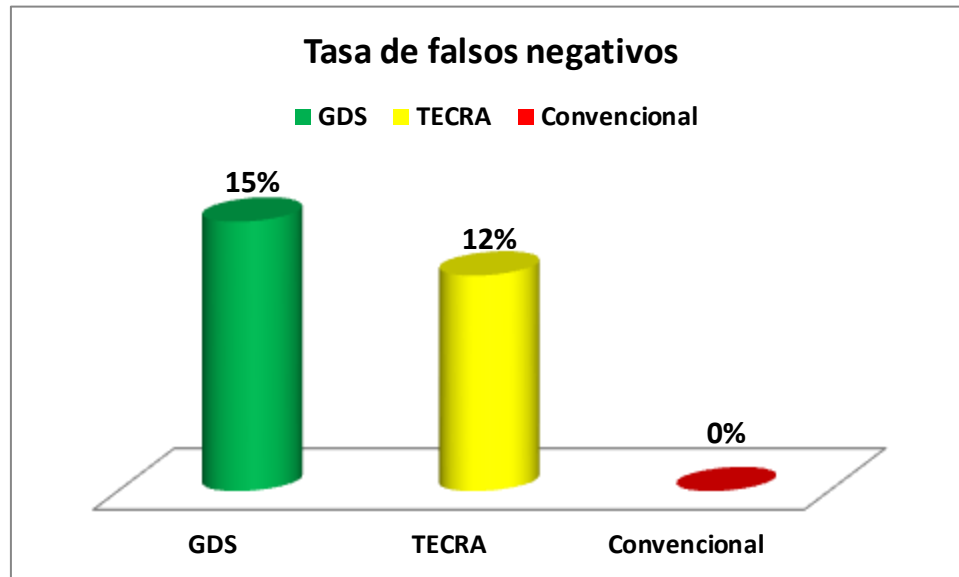
#### 5.4.6 Cálculo de Tasa de Falsos Negativos

Los falsos negativos, están constituidos por todos los resultados asignados en la prueba presuntiva, como negativos, pero que mediante técnicas convencionales, resultaron ser positivos.

Para observar, el comportamiento de los métodos en cuanto a este parámetro, la tabla No. 20 y figura No. 13, nos brinda el panorama general.

**Tabla No. 20** Tasa de falsos negativos

<b>Tasa de falsos negativos</b>	
<b>Método</b>	<b>Porcentaje</b>
GDS	15%
TECRA	12%
Convencional	0%



**Figura No. 13** Tasa de Falsos Negativos de los métodos evaluados

Nuevamente, el método molecular Assurance GDS System, posee el valor más alto, correspondiente a este parámetro, obteniendo un 15% de falsos negativos, contra un 12% del inmunoensayo VIA TECRA.

Este quizá es el parámetro que al tener porcentajes altos, genera mas alarmas, ya que, en la mayoría de las metodologías planteadas en los métodos alternativos, se establece que todas las respuestas negativas presuntivas, son certeras, es decir; solo las muestras que resultan positivas en la prueba presuntiva, son las que pasan a la etapa confirmativa, y todos las muestras que resultan negativas, se descartan, asumiéndose "ausencia" del patógeno en estudio.

Razón por la cual, observando nuestros resultados, mediante la utilización de los métodos ensayados, existe una posibilidad de estar liberando muestras (12-15)% "presuntivamente negativas", que al seguir el método convencional, son "confirmadas positivas", lo que genera que una proporción de las muestras que poseen al patógeno, no pudieron ser detectadas mediante los métodos alternativos. Razón por la cual en 5.4.7 se realiza el análisis de datos



discrepantes, para evaluar a los métodos, y tener un criterio adicional para caracterizarlos.

#### 5.4.7 Análisis de datos discordantes.

ISO 16140:2003, nos provee en el anexo F, una herramienta para evaluar a los métodos alternativos, frente al método de referencia.

Para este fin, hacemos uso de la ecuación:

$$Y = PD + ND$$

Donde

PD, están representadas por las desviaciones positivas o Falsos Positivos

ND, lo constituyen, las desviaciones negativas, o Falsos Negativos

Para su aplicación, debemos contar para cada método el número de falsos positivos y falsos negativos obtenidos, lo cual se presenta en la tabla No. 21.

**Tabla No. 21** Resumen de datos discordantes

PARAMETROS	GDS	TECRA
Falsos Negativos (ND, FN)	9	7
Falsos Positivos (PD,FP)	7	5

##### 5.4.7.1 Comprobación de los métodos, al evaluar si son comparables a su referencia, respecto a Sensibilidad y Especificidad.

Evaluación de GDS

$$Y = PD + ND$$

$$Y=7+9$$

$$Y=16$$

Teniendo este valor, se considera:

- Si  $Y < 6$ , no hay prueba disponible, no hay diferencias significativas.
- Si  $6 \leq Y \leq 22$ , (es decir, entre 6 y 22 desacuerdos), determine m como el más pequeño de los dos, valores de PD y ND (para este caso  $m = PD =$

7, debido a  $PD < ND$ ) y usar la ley binomial de acuerdo con la tabla No. 6, presentada en el numeral 4.5.2.

**Tabla No. 6** Valores de M para Y discrepancias ( $6 \leq Y \leq 22$ )

Discrepancias $Y = PD + ND$	6 a 8	9 a 11	12 a 14	15 a 16	17 a 19	20 a 22
M=Max(m) para $\alpha < 0.05$	0	1	2	3	4	5

Si  $m \leq M$  para un Y dado, los dos métodos son diferentes, con un  $p < 0,05$ .

Para nuestro caso, al evaluar a Assurance GDS, tenemos 16 desacuerdos, por lo que el M correspondiente es 3, al observar la tabla No. 6.

Dado que  $m=7$ , y  $M=3$

$m \geq M$ , por lo que se considera que los métodos evaluados Assurance GDS y convencional son iguales con un  $p < 0,05$ .

Evaluación de TECRA

$Y = PD + ND$

$Y = 5 + 7$

$Y = 12$

Para este caso, al evaluar a TECRA, tenemos 12 desacuerdos, considerando la tabla No. 6 tenemos:

**Tabla No. 6** Valores de M para Y discrepancias ( $6 \leq Y \leq 22$ )

Discrepancias $Y = PD + ND$	6 a 8	9 a 11	12 a 14	15 a 16	17 a 19	20 a 22
M=Max(m) para $\alpha < 0.05$	0	1	2	3	4	5

$M=2$

Dado que  $m=5$ , y  $M=2$

$m \geq M$ , por lo que se considera que los métodos evaluados VIA TECRA y convencional son iguales con un  $p < 0,05$ .

Según ISO 16140:2003, para  $Y > 22$ , (más de 22 desacuerdos), utilice la prueba de McNemar con la distribución de chi-cuadrado, que se describe en 4.5.3 y 5.4.8.

#### 5.4.8 Chi cuadrado de McNemar

Siguiendo lo descrito por AOAC, McNemar provee una herramienta para lograr evaluar si entre un método alternativo y la referencia, no existen diferencias estadísticamente significativas. Para ello se hace uso de la fórmula:

$$: \chi^2 = \frac{(|a - b| - 1)^2}{a + b}$$

Se considera lo siguiente:

$a$  = muestras de prueba positivas por el método alternativo pero probadas como negativas por el método de referencia, es decir Falsos Positivos.

$b$  = muestras asignadas como negativas por el método alternativo pero confirmadas como positivas por el método de referencia, o Falsos Negativos.

Grados de libertad ( $g$ ) = 1

##### 5.4.8.1 Evaluación de Assurance GDS

Retomando lo descrito en la tabla No. 14.

$a=7$

$b=9$

$$x^2 = \frac{(|7 - 9| - 1)^2}{7 + 9}$$

$$x^2 = 0.0625$$

Un valor de Chi cuadrado  $<3.84$  indica que las proporciones positivas para el método alternativo y el de referencia no son estadísticamente significativas al 5% de nivel de significancia. En cambio, un valor de Chi cuadrado  $\geq 3.84$  indica que la proporción de positivos confirmados por el método alternativo y por el de referencia difiere significativamente a una  $P \leq 0.05$ .

Por lo que, dado el valor de  $x^2 = 0.0625$ , no hay diferencia significativa, entre los métodos evaluados, GDS y convencional, con un  $\alpha = 0.05$ .

#### 5.4.8.2 Evaluación de VIA TECRA

Retomando lo descrito en la tabla No. 14.

$a=5$

$b=7$

$$x^2 = \frac{(|5 - 7| - 1)^2}{5 + 7}$$

$$x^2 = 0.083$$

Ya que el valor de  $x^2 = 0.083$ , y este a su vez es  $<3.84$ , se considera que las proporciones positivas para el método alternativo y el de referencia no son estadísticamente significativas al 5% de nivel de significancia. Por lo que el método VIA TECRA y el método convencional de cultivo, pueden considerarse como iguales.

#### 5.4.9 Evaluación general del método Assurance GDS System

Para evaluar de manera general el método molecular, conforme a los parámetros planteados, y descritos en las secciones anteriores, y adicionando lo establecido por AOAC, donde este parámetro se aplica sin especificar rangos de aplicabilidad, respecto al chi cuadrado planteado por McNemar, que nos

describe la existencia o no de diferencias significativas entre los métodos evaluados la tabla No. 18, nos presenta el resumen de dichos elementos que describen el desempeño del método, para nuestro fin específico, detectar *Salmonella spp*, en carne fresca de pollo. Para observar el cálculo de Chi cuadrado descrito por McNemar ver Anexo No. 17.

**Tabla No. 22** Resumen de parámetros de desempeño evaluados en Assurance GDS System.

<b>Assurance GDS System</b>	
<b>PARAMETRO</b>	<b>RESULTADOS</b>
Chi <sup>2</sup> McNemar	0.0625
Exactitud Relativa	83%
Sensibilidad	85%
Especificidad	81%
Tasa de falsos positivos	19%
Tasa de falsos negativos	15%

El test de significancia aplicando chi cuadrado, descrito por Mc Nemar, es una prueba que establece que la proporción de presuntivos confirmados por el método alternativo, no es estadísticamente diferente a la proporción de positivos confirmados por el método de referencia, para cada tipo de alimento. Por lo que el resultado planteado, solo es correspondiente a carne fresca de pollo.

Este parámetro planteado por McNemar, debe generar un resultado  $<3.84$  para indicar que la proporción de positivos por el método alternativo y el de método de referencia, no son estadísticamente diferentes con un nivel de 5% de significancia.

El resultado obtenido es de 0.0625, el cual es menor a 3.84, cumpliendo así con este criterio. De esta manera podemos considerar que no existen diferencias significativas, entre los métodos, Assurance GDS System y cultivo convencional, con un nivel de significancia del 5%.

#### 5.4.10 Evaluación general del método VIA TECRA

**Tabla No. 23** Resumen de parámetros de desempeño evaluados en el método VIA TECRA.

VIA TECRA	
PARAMETRO	RESULTADOS
Chi <sup>2</sup> McNemar	0.083
Exactitud Relativa	88%
Sensibilidad	88%
Especificidad	86%
Tasa de falsos positivos	14%
Tasa de falsos negativos	12%

El inmunoensayo VIA TECRA, obtuvo en general, mejor desempeño que el método molecular Assurance GDS System, ya que la Sensibilidad y Especificidad fueron más altas y las tasas de falsos positivos y falsos negativos, más bajas.

Además el chi cuadrado descrito por McNemar, fué más pequeño, ya que se obtuvo un valor de 0.62, tal como se detalla en la tabla No. 18. Lo que implica que no existen diferencias significativas, entre el inmunoensayo VIA TECRA y el cultivo convencional, con un nivel de significancia del 5%.

Siendo este método una alternativa aceptable para el análisis de *Salmonella*, en carne fresca de pollo.

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 Conclusiones

1. La carne fresca de pollo analizada fue un reservorio de *Salmonella* ya que se detectó al patógeno mediante los tres métodos ensayados, Assurance GDS System y VIA TECRA en un 59% de las muestras y con la técnica convencional de cultivo en un 61%.
2. El método VIA TECRA, obtuvo una mayor cantidad de resultados considerados como “Verdaderos Positivos”, al conseguir que 52 muestras presuntivamente positivas fueran correctamente asignadas, mientras que mediante el método Assurance GDS System, 50 muestras fueron confirmadas como positivas.
3. Al evaluar la cantidad de muestras correctamente asignadas como positivas al patógeno en estudio, el método VIA TECRA obtuvo un 88% de Sensibilidad mientras que Assurance GDS System fue sensible en un 85% de las muestras.
4. La mayor Especificidad la obtuvo el método VIA TECRA con un 86% de resultados negativos confirmados, conforme la referencia ISO 6579:2002, IDT, mientras que el Assurance GDS System consiguió un 81%.
5. La tasa de Falsos Positivos mostró que en un 19% de las veces el método Assurance GDS System emitió un resultado positivo presuntivo que no pudo ser confirmado, y en un 14% el método VIA TECRA tuvo el mismo inconveniente.
6. La Tasa de Falsos Negativos para el método VIA TECRA fue de 12% y para el método Assurance GDS System del 15%.



7. No existió diferencia estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre los métodos Assurance GDS System y VIA TECRA contra el método horizontal para la detección de *Salmonella* (ISO 6579:2002, IDT). Este criterio es aplicable específicamente para carne fresca de pollo. Por lo que se determina que los métodos en estudio son comparables entre sí.
8. Los resultados muestran que la metodología molecular por PCR (Assurance GDS System) y el inmunoensayo visual (VIA TECRA *Salmonella*) ofrecen una alta sensibilidad y especificidad en la detección de *Salmonella* en la matriz evaluada, lo que conlleva a beneficios al sector salud, debido a que logran un diagnóstico rápido, además que existe una buena relación costo-beneficio al sector productivo, porque le permite la liberación de productos alimenticios al mercado con mayor rapidez.
9. La PCR para *Salmonella*, así como el inmunoensayo visual, complementa pero no reemplaza las técnicas microbiológicas tradicionales, debido a que los resultados positivos presuntivos deben confirmarse por el método convencional, este paso es siempre exigido por las referencias oficiales, además que los resultados confirmados son necesarios para propósitos epidemiológicos.

**VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7. Recomendaciones

1. Tomar las medidas pertinentes, por parte de los consumidores frente a la carne fresca de pollo, integrando en su práctica cotidiana las cinco claves de la inocuidad promovidas por Organización Mundial para la Salud, que incluyen limpieza, separación de alimentos crudos y cocinados para evitar contaminación cruzada, realizar una correcta y completa cocción de los alimentos, tener estricto control de las temperaturas de refrigeración, y el uso de agua y materias primas inocuas.
2. Realizar estudios de comparación de métodos con otras tecnologías analíticas de detección de patógenos, ampliamente difundidas en el mercado.
3. Evaluar los métodos sujetos al presente estudio, con otras matrices, tanto inoculadas artificialmente a diferentes concentraciones, como con muestras naturales, que se acoplan a la realidad en los laboratorios, para lograr considerar la idoneidad de los métodos, sus limitantes y desviaciones.
4. Mantener un estricto control de las condiciones ambientales, bajo las cuales se desarrolla la comparación de métodos, ya que pequeñas interferencias, pueden generar grandes desvíos, al emitir falsos positivos, falsos negativos, provenientes de fallas en el proceso, que desvirtúan los resultados que se obtengan.
5. Respetar cada etapa y requerimiento que el método convencional de cultivo establezca, ya que el microorganismo *Salmonella spp* puede verse

afectado por variaciones en temperaturas y tiempos de incubación. Así como por la calidad de los medios de cultivo.

6. Evaluar la aptitud de un método microbiológico llevando en simultáneo con las muestras de análisis, controles positivos y negativos, los cuales están constituidos por cepas de colección certificadas, los cuales aportan validez a los procesos analíticos.
7. Crear a nivel nacional una guía o política de validación de métodos alternativos, ya que en la actualidad se deben revisar referencias internacionales para tal fin.
8. Generar un proceso de mejora continua dentro de los laboratorios de análisis microbiológico, al evaluar las metodologías alternativas contra el método de referencia previo a su uso cotidiano, para emitir resultados confiables, y ser fuentes fidedignas de información, respecto a la calidad e inocuidad de un determinado producto sometido a análisis.

## **BIBLIOGRAFIA**

## BILIOGRAFIA

1. Alvarez H. (2013) Validación de dos métodos de detección de *Salmonella spp.* en embutidos artesanales, distribuidos en mercados municipales del departamento de Guatemala. (Tesis de maestría). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.  
Recuperado de [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_3386.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3386.pdf)
2. AOAC. (2002).Cap. 17, Official Method 998.09, *Salmonella* in Foods. Official Method of Analysis of AOAC International, pp. 126-130, ed. 17.
3. AOAC. (2009). Official Method 2009.03, *Salmonella* in foods and environmental surface.Official Method of Analysis of AOAC International.
4. AOAC. (2002 )International Methods Committee Guidelines For Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. Appendix X.
5. Barakat M. (2012). *Salmonella* Detection Methods for Food and Food Ingredients. En *Salmonella –A dangerous foodborne pathogen.* (pp. 373-392). *University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.*
6. Biocontrol, Assurance GDS *Salmonella*. Instructivo Técnico.
7. BS EN ISO 16140:2003 (2005) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods-Londres. BSI 389.
8. Cádiz, NL. (2014). Verificación de un método basado en bacteriófagos para detección de *Salmonella spp.*en muestras de ámbito alimentario. Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias.

Recuperado de:

<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/132007/Verificaci%C3%B3n-de-un-m%C3%A9todo-basado-en-bacteri%C3%B3fagos-para-detecci%C3%B3n-de-Salmonella-spp.-en-muestras-del-%C3%A1mbito-alimentario.pdf?sequence=1>

9. Carrascal AK, Correa DX. (2012). Perfil de riesgo *Salmonella spp* (no tifoideas) en pollo entero y en piezas. Instituto Nacional de Salud de Colombia. Edición 1.
10. Diario Oficial de la Unión Europea L325/1. (2003). Reglamento (CEE) No. 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo. Sobre el control de la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos).
11. Ebrahim R., Shakerian A, Ghasemi A. (2013). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fish, shrimp, lobster, and crab in Iran. *CompClinPathol*, 22:59-62.
12. FAO, OMS. (2005). Evaluación de riesgos de *Salmonella* en huevos y pollos para asar 1. Resumen interpretativo.
13. Feldsine PT, Jucker MT, Kaur M; Lienau, Andrew HK, David E. (2010). AOAC International Journal, Evaluation of the Assurance GDS® for *Salmonella* Method in Foods and Environmental Surfaces: Multilaboratory Collaborative Study. 93(1): 150-162.
14. Fernández CF. (2004). Aplicaciones de las técnicas de PCR a la

epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas.

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Recuperado en:  
[https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/microbiologia\\_molecular/ccs-2011-microbmolecular1.pdf](https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/microbiologia_molecular/ccs-2011-microbmolecular1.pdf)

15. Figueroa IM., Rodríguez AV. (2005), Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Revista Latinoamericana de Microbiología. México. 47:(1-2).
16. FSIS, USDA. (2015). Federal register Vol.80 No.16 Monday, January 26, Notices.
17. González I., Martín R., García, T., Morales, P., Sanz, B. & Hernández, P. E. (1994). Detection of *Pseudomonas fluorescens* and related psychrotrophic bacteria in refrigerated meat by a sandwich ELISA. Journal of Food Protection. 57, 710-714.
18. González MY, Palomino CC. (2012). Acciones para la gestión de la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos en un restaurante con servicio bufet. Rev Gerenc Polit Salud. 11(22), 123-140.
19. González T, Rojas R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Salud Pública México. 47(5):388-90.
20. Grimont PA, Weill F.X. (2007). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella-Institut Pasteur, Paris. France. Recuperado de:  
<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>)



21. ISO 6579:2002 IDT. (2008). Microbiología de alimentos de consumo humano y animal —Método Horizontal para la Detección de *Salmonella* spp — Método de Referencia, 1º edición.
22. Kyung-Min L. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety, Food Control. 47, 264-276.
23. Martín de Santos, R. Métodos Rápidos y Automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. España, Universidad Complutense de Madrid. Recuperado de:  
[www.analesranf.com/index.php/mono/article/download/1108/1125](http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/download/1108/1125)
24. OAA, Organismo Argentino de Acreditación (2013) Guía para la validación de métodos microbiológicos. Argentina.
25. Organización Mundial de la Salud. Temas de salud. Enfermedades de transmisión alimentaria.  
Recuperado de: [http://www.who.int/topics/foodborne\\_diseases/es/](http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/)
26. Organización Mundial de la Salud. *Salmonella* no tifoidea. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
27. Ortega GN, Rodríguez MC, Zhurbenko R. (2010) Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Métodos cualitativos. Cuba. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 48(2)162-176. <http://scielo.sld.cu>.

28. Pachon DA. (2009). Aislamiento, identificación y serotipificación de Enterobacterias del género *Salmonella* en una población de *Cocodylus intermedius* y Testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical Roberto Franco E.B.T de la Facultad de Ciencias- Universidad Nacional de Colombia en Villavicencio-META. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado de <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis198.pdf>.
29. Palomino CC, González MY. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Perú, RevPeruMedExp Salud Pública. Recuperado de: <http://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/v31n3/a20v31n3.pdf>
30. Parra M., Durango J., Mattar S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. España, Córdoba.
31. Robledo LA. (2015). Investigación de *Salmonella spp* en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos. España, Universitat Politècnica de Catalunya. Recuperado de: <http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/26111/memoria.pdf>
32. Sánchez M. Cardona N.,(2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. Asociación Colombiana de Infectología, 7 - 1.
33. Sistema Nacional de Vigilancia epidemiológica, VIGEPES. (2015), Ministerio de Salud de El Salvador (MINSAL).

34. WHO. (2008) Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Salmonella spp.* WHO global SalmSurv.
35. Yanez E. (2008). Determinación de *Salmonella spp* por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. Infect., 12(4). Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n4/v12n4a03.pdf>

## **GLOSARIO**

## **Glosario**

**Métodos alternativos:** Métodos que han sido validados por comparación con el método de referencia que corresponda, de acuerdo a un estándar aceptado (ej. ISO 16140, ISO/TR 13843, ISO 17994) y son reconocidos formalmente como equivalentes al método de referencia por un organismo competente de acuerdo a los datos experimentales obtenidos.

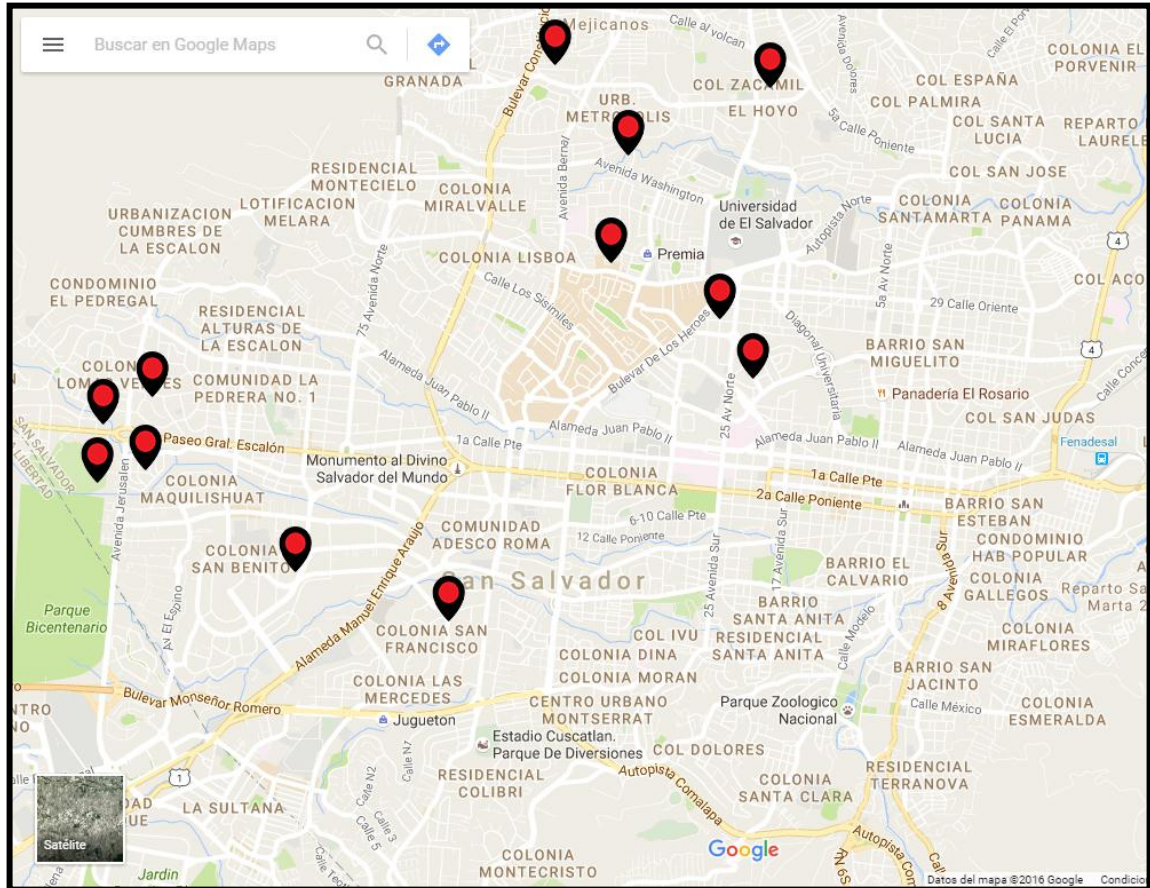
**Sensibilidad:** Capacidad del método de detectar el microorganismo diana, cuando éste está presente.


**Especificidad:** Capacidad de un método de no detectar el microorganismo diana, si éste no está presente.

**Ct (ThresholdCycle):** El “Threshold Cycle”, Ciclo de umbral o Valor Ct, es el ciclo en el cual la fluorescencia alcanza un umbral definido. Este corresponde al ciclo en el cual un aumento estadísticamente significativo de fluorescencia es primeramente detectado. Por lo tanto, el número de ciclos necesarios para que la fluorescencia asociada a la amplificación alcance un umbral específico de detección (el valor de CT) está inversamente correlacionada con la cantidad de ácido nucleico que estaba en la muestra original.

**ANEXOS**

## ANEXO 1



 Punto de muestreo.

**Figura No. 14** Mapa de ubicación de los puntos de muestreo

## ANEXO 2

### LISTADO GENERAL DE MATERIAL, EQUIPO Y MEDIOS DE CULTIVO

**Detección, aislamiento e identificación de *Salmonella spp.* en muestras de Alimentos** (Procedimiento según International Standard ISO 6579: 2002)

- Pipetas estériles de 1 mL, 10 mL (descartables o de vidrio)
- Micropipetas con capacidad de 100µL, 200 µL y/o 1000 µL.
- Pipeteador
- Cajas de petri 100 x 15 mm, de una cavidad. Descartable
- Tubos de vidrio con tapón de rosca de 20x150 mm
- Tubos de vidrio con tapón de rosca de 13x100 mm
- Frascos de vidrio con tapón de rosca con capacidad para 250 mL o 500 mL
- Baño de agua a  $(43 \pm 0.2)^\circ \text{C}$ ,  $(42 \pm 0.2)^\circ \text{C}$
- Incubadora  $(35^\circ \pm 1)^\circ \text{C}$
- Contador de colonias
- Stomacher
- Bolsas para Stomacher
- Asas bacteriológicas en anillo (de 3 mm o 10 µL) o palillos estériles
- Asas bacteriológicas en punta
- Puntas descartables de 100µL, 200 µL y 1000 µL.
- Mechero Bunsen
- Cucharas, pinzas o bajalenguas estériles para la transferencia de muestras de alimentos
- Balanza semianalítica
- Agitador Vortex
- Gradilla
- Guantes, gorros, mascarillas



- Cabina de flujo laminar
- Autoclave

## **REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO**

- Agua peptonada 1%
- Caldo Rappaport – Vassiliadis (CRV)
- Caldo Tetracionato verde brillante (MKTTn)
- Agar Sulfito Bismuto (SB)
- Agar Xilosa – Lisina- Desoxicolato (XLD)
- Agar Hektoen (HE)
- Agar MacConkey (McC)
- Agar tripticasa soya (TSA)
- Caldo tripticasa soya (TSB)
- Leche descremada en polvo reconstituida
- Agar hierro triple azúcar (TSI) inclinado
- Agar Hierro Lisina (LIA) inclinado
- Caldo urea
- Solución de novobiocina (0.04 g de sal sódica de novobiocina en 5 mL de agua, esterilizar por filtración)
- Agua verde brillante (Preparar el agua verde brillante añadiendo 2 mL de solución verde brillante 1 % por 1000 mL de agua destilada estéril).
- Solución de Verde brillante al 0.1 % (preparado con agua estéril)
- Solución de verde brillante 1%
- Solución de yodo/yoduro (preparado con agua estéril)
- Galería bioquímica miniaturizada (API 20E), tarjetas ID-GN para equipo automatizado VITEK 2 u otros sistemas bioquímicos comerciales

## **Metodología para el aislamiento, detección e identificación de *Salmonella spp* mediante método screening Assurance GDS**

### **MATERIAL Y EQUIPO**

- Pipetas estériles de 1 mL, 10 mL
- Cajas de petri 100 x 15 mm, de una cavidad. Descartable
- Tubos de vidrio con tapón de rosca de 20x150 mm
- Tubos de vidrio con tapón de rosca de 13x100 mm
- Frascos de vidrio con tapón de rosca con capacidad para 250 mL o 500 mL.
- Baño de agua a  $43 \pm 0.2^\circ \text{C}$ ,  $42 \pm 0.2^\circ \text{C}$
- Incubadora  $35^\circ \pm 2^\circ \text{C}$
- Contador de colonias
- Stomacher
- Bolsas para Stomacher
- Asas bacteriológicas en anillo (de 3 mm o 10  $\mu\text{L}$ )
- Asas bacteriológicas en punta o palillos estériles
- Puntas descartables de 100 $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$ .
- Mechero Bunsen
- Cucharas, pinzas o bajalenguas estériles para la transferencia de muestras de alimentos
- Balanza semianalítica
- Agitador Vortex
- Gradilla
- Guantes, gorros, mascarillas
- Cabina de flujo laminar
- Autoclave
- Assurance GDS Rotor-Gene

- Computadora y su software
- Pipeta repetidora
- GDS Agitador Vortex
- GDS Bloque base de concentración de muestras
- Pickpen y puntas pickpen
- GDS Celdas de concentración de muestras
- GDS Placas de resuspensión
- GDS Film adhesivo protector
- Puntas estériles desechables para pipeta repetidora: (0.2, 0.5,10) mL
- Puntas desechables estériles para micropipeta de 0.2 mL y 1 mL
- Bloque frío de gel

## **REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO**

- Agua peptonada 1%
- Kit GDS Salmonella Biocontrol (Tubos de amplificación Tq, Reactivo de concentración, buffer de resuspensiónTq, Solución de lavado)
- Enzima polimerasa recomendada por el kit GDS
- Caldo Rappaport – Vassiliadis (CRV)
- Caldo Tetrionato verde brillante (MKTTn)+ solución de novobiocina
- Agar Sulfito Bismuto (SB)
- Agar Xilosa – Lisina- Desoxicolato (XLD)
- Agar Hektoen (HE)
- Agar tripticasa soya (TSA)
- Agar hierro triple azúcar (TSI)
- Agar Hierro Lisina (LIA)
- Caldo infusión cerebro corazón (BHI)
- Solución de novobiocina (0.04 g de sal sódica de novobiocina en 5 mL de agua, esterilizar por filtración)

- Solución de Verde brillante al 0.1 % (preparado con agua estéril)
- Solución de yodo/yoduro (preparado con agua estéril)
- Solución salina al 0.85%
- Galería bioquímica miniaturizada (API 20E) o tarjetas ID-GN para equipo automatizado VITEK
- Etanol al 70%
- Lejía (hipoclorito de sodio al 1.2% -2.0 %)

**Metodología para la detección de *Salmonella spp.* en alimentos (Inmunoensayo colorimétrico de enzima policlonal). Método AOAC OfficialMethod 998.09, 17.9.24.**

#### **MATERIAL Y EQUIPO**

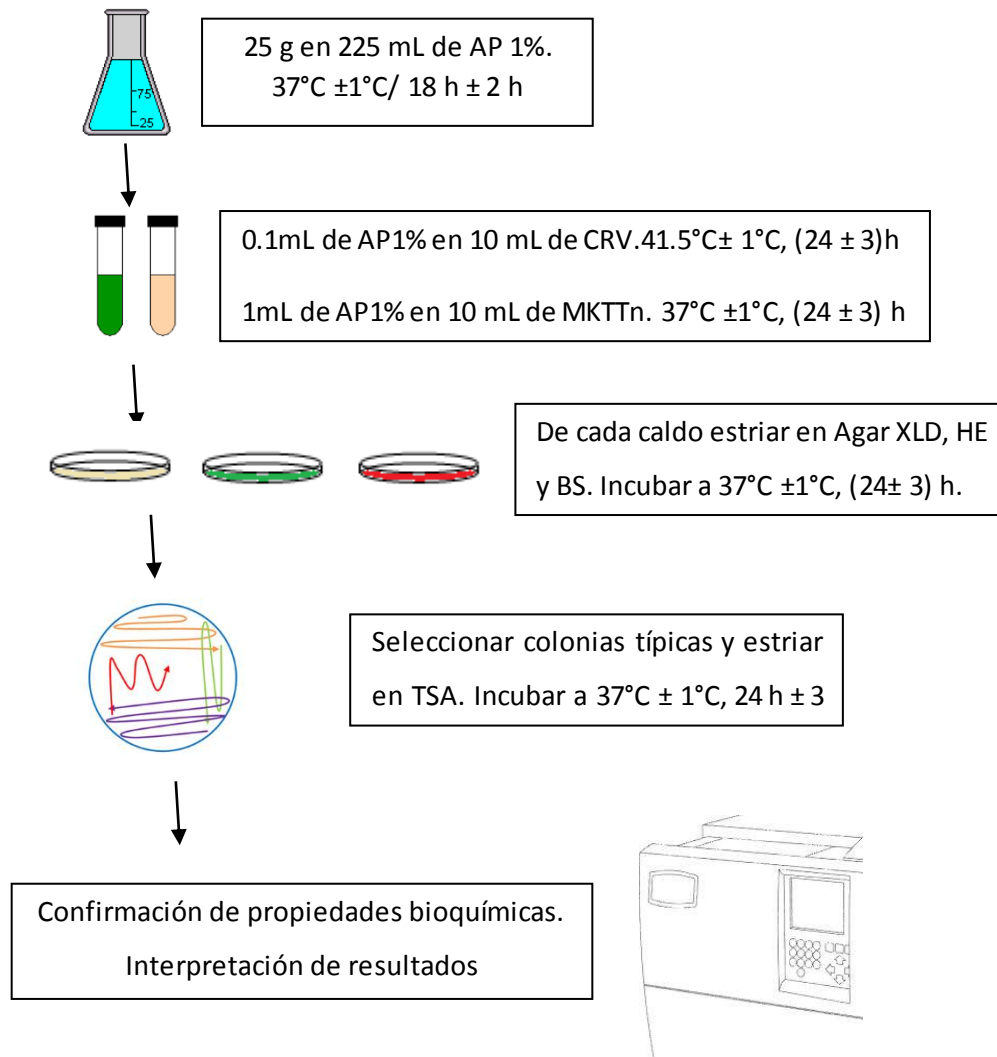
- Pipetas serológicas de 1 mL
- Puntas estériles de 0.2 y 0.02 mL.
- Pipeta repetidora
- Tubos con rosca de (13 x 100) mm
- Cajas de petri(100 x15) mm
- Incubadora (35° ±2)° C y (28-30)° C
- Contador de colonias
- Frascos para dilución de 500 mL
- Agitador mecánico o Vortex
- Stomacher
- Frasco plástico lavador
- Baño de agua
- Carta comparadora de color
- Pocillos con anticuerpos para Salmonella
- Gradilla

- Cabina de flujo laminar
- Gorro, guantes, mascarilla, gabacha
- Asas bacteriológicas
- Microscopio
- Mechero
- Portaobjeto y cubreobjeto
- Papel parafilm
- Tubos con tapón de rosca de (13x125) mm

## **REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO**

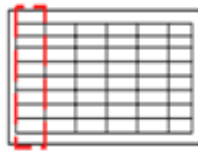
- Agua peptonada 1%
- Caldo Tetrionato (CTT)
- Caldo Rapaport Vassiliadis (CRV)
- Agar Hektoen (HE)
- Agar Xilosa-lisina –desoxicolato (XLD)
- Agar Sulfito bismuto (SB)
- Agar tripticasa soya (TSA)
- Agar Triple azúcar hierro (TSI)
- Agar Lisina hierro (LIA)
- Galería miniaturizada API 20E o tarjeta ID-GN para VITEK 2
- Kit VIA TECRA *Salmonella* ( Control de lavado, Control positivo del kit Diluyente del control, Diluyente del conjugado, Conjugado, Diluyente del substrato, Substrato, Solución “stop”, Caldo M).

### ANEXO 3

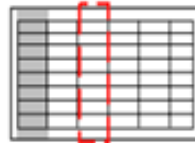


**Figura No.15** Esquema de detección, aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en muestras de Alimentos (Procedimiento según International Standard ISO 6579: 2002)

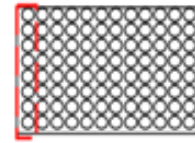
## ANEXO 4



Bloque de muestras  
Reactivo de  
concentración 20 $\mu$ L



Bloque de  
muestras

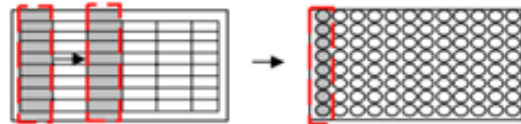


Buffer de re  
suspensión

### Preparación de la muestra:



1mL de muestra enriquecida a los  
pocillos con reactivo de concentración.  
Cubrir y agitar por (10-20) min

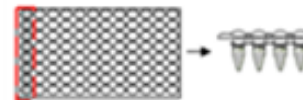


Con la Pickpen transferir las muestras a pocillos con BHI,  
liberar partículas. Cubrir e incubar por (2-4) h a (35-37) °C.  
Con la pickpen transferir las muestras en BHI al plato de  
resuspensión.

### Amplificación y detección:



Colocar los tubos de  
amplificación necesarios en  
el bloque frío



Transferir 30  $\mu$ L de muestra del plato de  
resuspensión a los tubos de Amplificación y  
colocarlos en el Assurance GDS. Iniciar  
corrida.

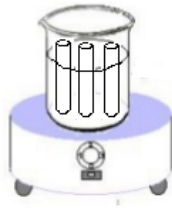
Las muestras presuntivas positivas por  
este método, se confirmarán mediante el  
método convencional a partir del AP1%

**Figura No.16** Esquema del método Assurance GDS System.

## ANEXO 5



A partir de los enriquecimientos en CRV y CTT transferir 1 mL en cada uno de dos tubos con Caldo M e incubar a (35-37)°C por (16-20)h



Transferir 0.5 mL de cada uno de los enriquecimientos en Caldo Ma un tubo con rosca, ebulir por (10-15)min. Dejar enfriar



+ 0.2 mL de cada muestra hervida dentro de pocillos individuales.



Incubar por 30 min a (35-37) °C

1er lavado: Lavar y vaciar completamente los pocillos 3 veces



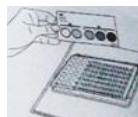
Adición del conjugado: 200µL a cada pocillo. Cubrirlos e incubar por 30 min a (36±1) °C.



2do lavado: Lavar y vaciar completamente los pocillos 4 veces



Adición del sustrato: 200µL a cada pocillo. Cubrirlos e incubar por 15 min a (20-25) °C.



Lectura de resultados con carta de color. Los resultados presuntivos positivos se confirmarán por el método convencional a partir de los caldos RV, MKTTn, y M.

**Figura No.17** Esquema del Inmunoensayo colorimétrico de enzima policlonal *Salmonella*. AOAC Official Method 998.09.



ANEXO 6

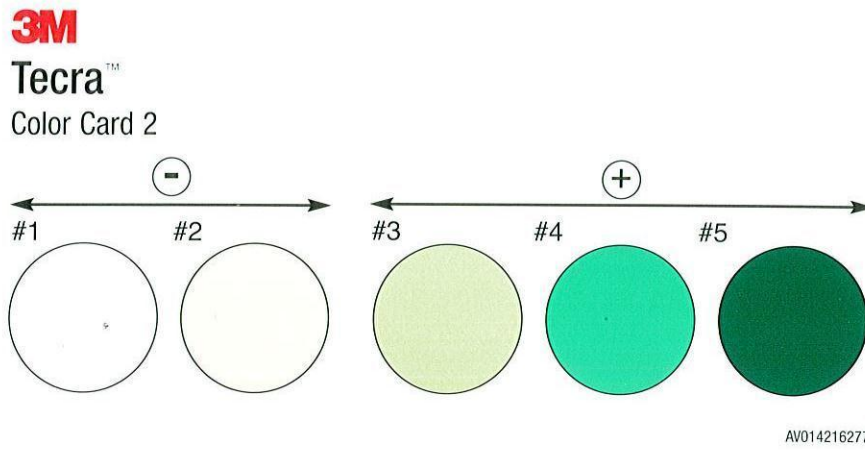
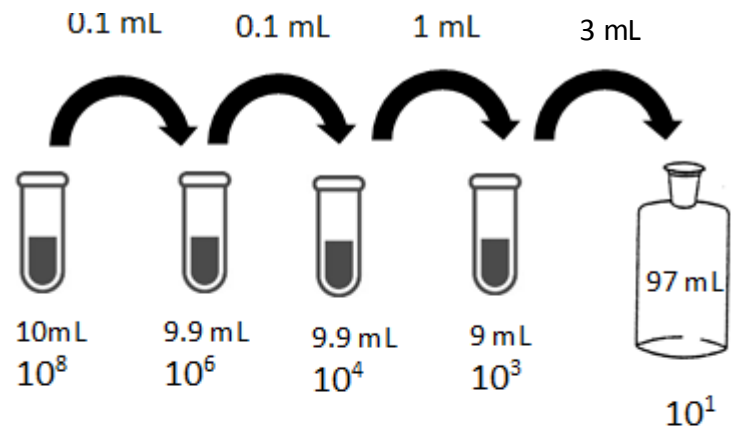
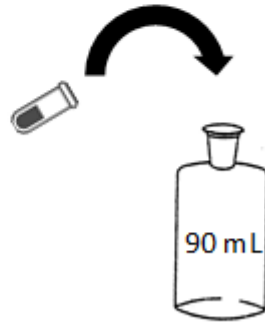


Figura No. 18 Color Card 2 (Carta de color) para interpretación de resultados

## ANEXO 7



Control positivo. Cepa de *Salmonella* ATCC 14028.



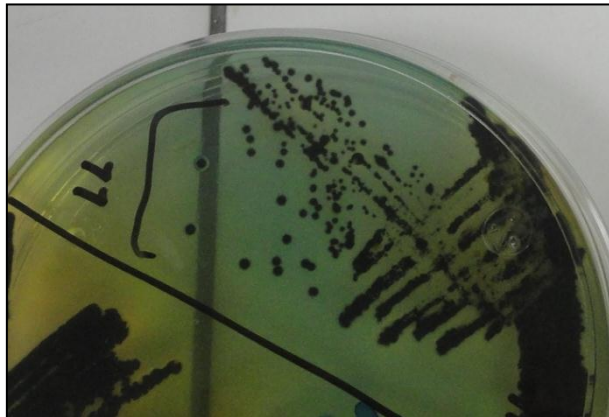
Control positivo. Cepa de *E. coli* ATCC 25922.

**Figura No. 19** Esquema de preparación de los controles positivos y negativos.

## ANEXO 8



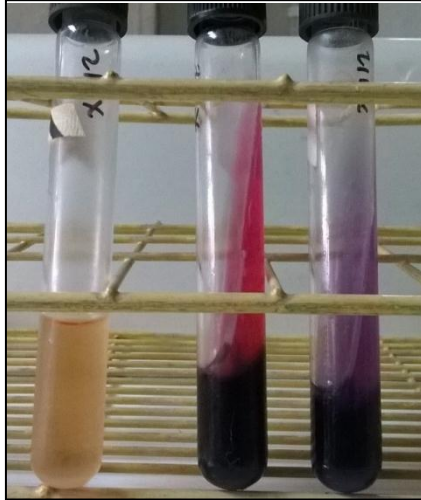
Colonias características de *Salmonella spp.* en Agar XLD



Colonias características de *Salmonella spp.* en Agar HE


**Figura No. 20** Crecimiento característico de *Salmonella spp.* en Agares Selectivos.

## ANEXO 9



**Figura No. 21** Pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella spp.*, LIA, TSI y Urea típicas.


## ANEXO 10



CE 07223 C

REF: mx 152     2016/10/14

Origine / Source / Herkunft /  
 Origen / Origen / Προέλευση / carne fresca de pollo  
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

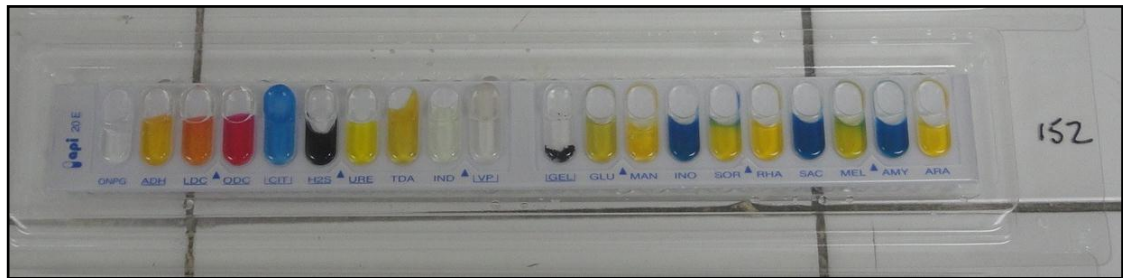


1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
ONPG	ADH	LDC	ODC	LCIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	LVP	IGEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	MOB	McC	OF-0	OF-F						
4			7			0			4			5			5			2														

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
 Andre tests / Inne testy : JT/CA  
TSI/LIA τριπλός du Salmonella ure (-)

Ident. / Ταυτοποίηση : 95.1%  
Salmonella spp.

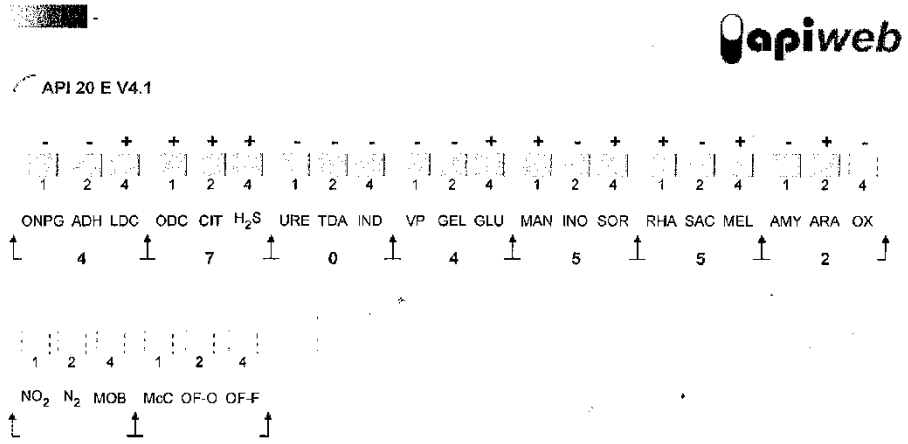


**Figura No. 22** Ejemplo de prueba bioquímica miniaturizada. API 20E, positiva para *Salmonella spp.*

# ANEXO 11

apiweb™ - Resultado de identificación

Página



**REFERENCIA**  
Mx 152 carne fresca de pollo

**FECHA**  
14/10/16

**COMENTARIO**  
Colonia aislada a partir de cultivo en agar XLD. TSI/LIA típicos de Salmonella, UREA negativa.

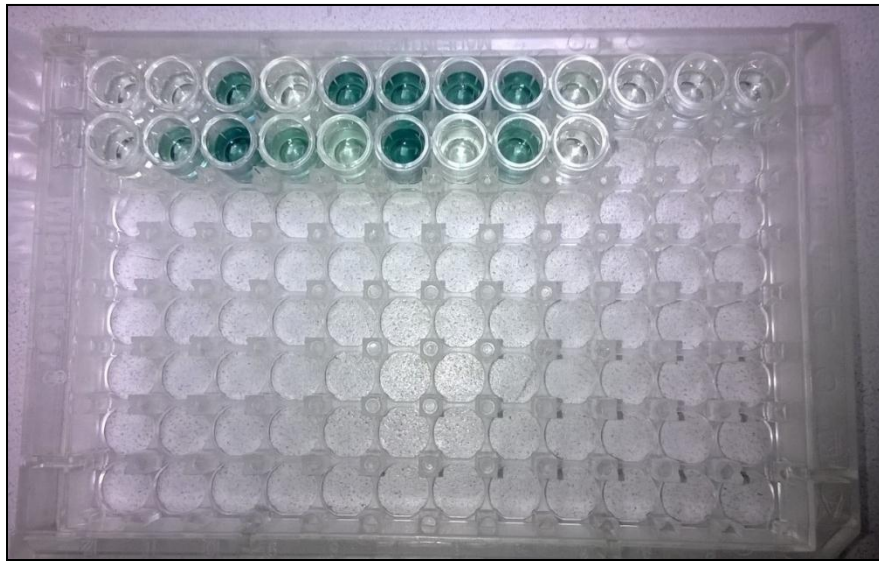
**EXCELENTE IDENTIFICACION EN EL GENERO**

**Galería** API 20 E V4.1  
**Perfil** 4 7 0 4 5 5 2  
**Nota** CONFIRMAR POR PRUEBAS SEROLOGICAS

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
Salmonella spp	95.1	0.98	
Salmonella choleraesuis ssp arizonae	4.8	0.67	ONPG 98% ADH 75%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
Salmonella choleraesuis ssp choleraesuis	0.1	0.2	CIT 6% MEL 20% ARA 0%

**Figura No. 23** Ejemplo de lectura emitida por software API WEB, positiva para *Salmonella spp.*

## ANEXO 12



**Figura No 24** Resultado de inmunoensayo VIA Tecra *Salmonella*

## ANEXO 13

# BIOCONTROL

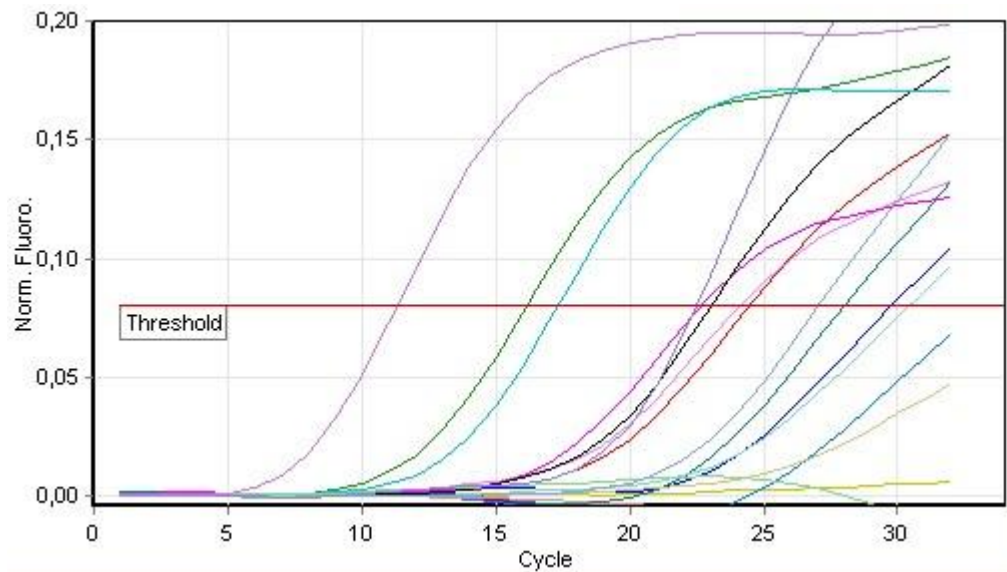
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

RunName	Salmonella en carne de pollo 111016
RunStart	11/10/2016 14:22:06
RunFinish	11/10/2016 15:44:31
Operator	Assurance GDS user
Notes	
RunOn Software Version	Rotor-Gene 1.7.105.1
RunSignature	The Run Signature is valid.

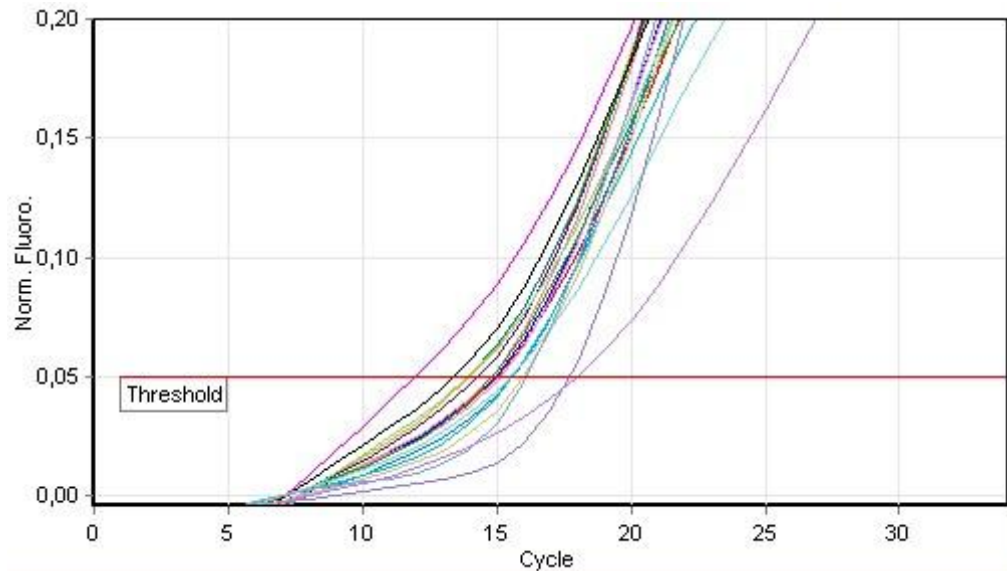
Assay: Salmonella

### Salmonella















## Internal Control



## Salmonella

No. C	Name	Salmonella	Salmonella Result	Salmonella Ct	Assay	Kit Lot Number	Description	
1		113	Positive	+	24,44	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
2		114	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
3		115	Positive	+	29,78	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
4		116	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
5		117	Positive	+	24,09	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
6		118	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
7		119	Positive	+	27,98	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
8		120	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
9		121	Positive	+	16,16	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
10		122	Positive	+	22,66	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo

No.	C	Name	Salmonella	Salmonella Result	Salmonella Ct	Assay	Kit Lot Number	Description
11		123	Positive	+	23,05	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
12		124	Positive	+	17,34	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
13		125	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
14		126	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
15		127	Positive	+	30,42	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
16		128	Positive	+	27,04	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
17		c1	Positive	+	22,50	Salmonella	012314-05	
18		c2	Positive	+	11,32	Salmonella	012314-05	

**Figura No. 25** Resultados emitidos por GDS correspondientes a corrida 1.

# BIOCONTROL

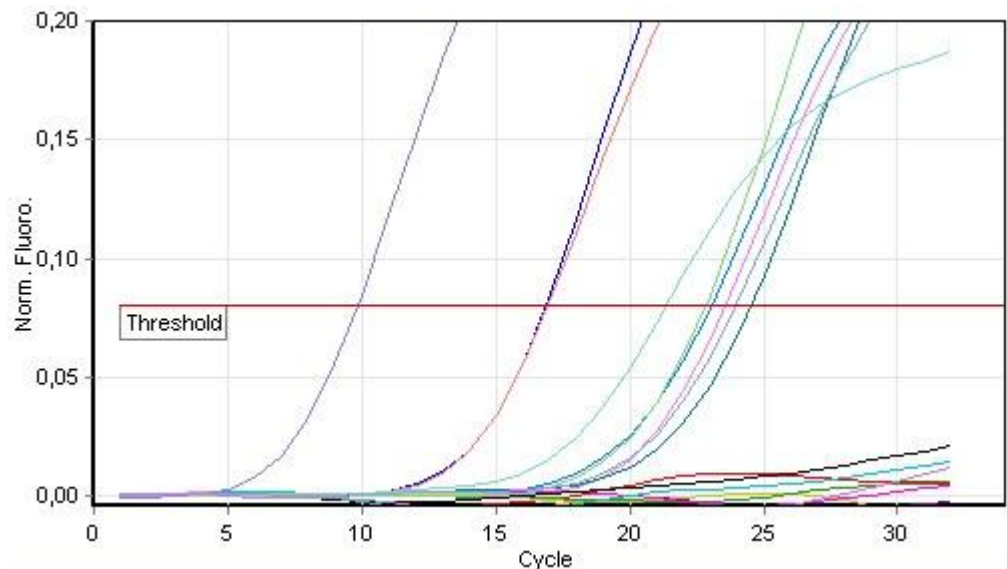
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

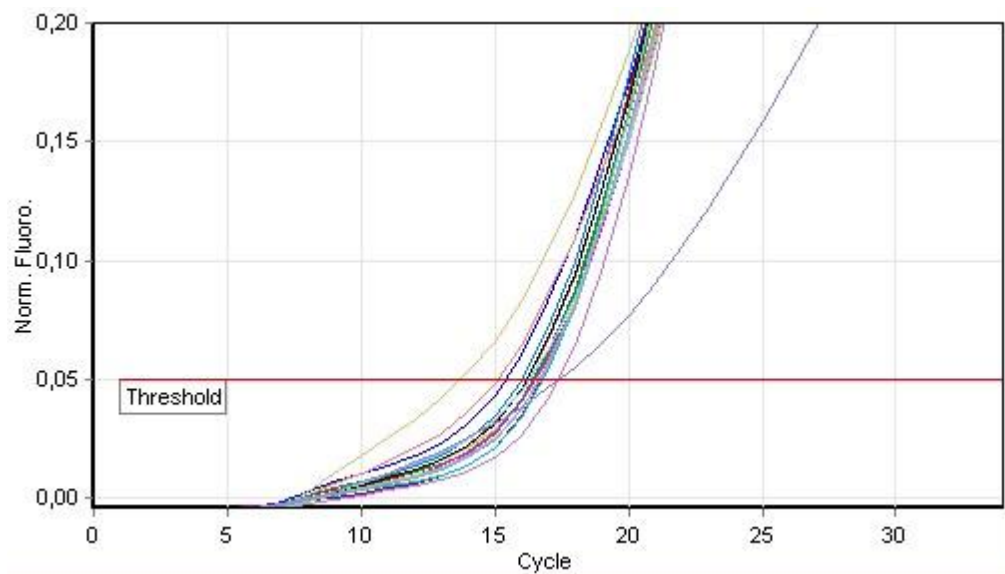
RunName	Salmonella en carne de pollo 121016
RunStart	12/10/2016 12:26:07
RunFinish	12/10/2016 13:49:47
Operator	Assurance GDS user
Notes	
RunOn Software Version	Rotor-Gene 1.7.105.1
RunSignature	The Run Signature is valid.

Assay: Salmonella

### Salmonella



## Internal Control



## Salmonella

No	C	Name	Salmonella	Salmonella	Salmonella	Assay	Kit Lot	Description
.			a	Result	Ct		Number	
1		129	Negative	-		Salmonella	012314-05	Carne de pollo
2		130	Negative	-		Salmonella	012314-05	Carne de pollo
3		131	Positive	+	16,90	Salmonella	012314-05	Carne de pollo
4		132	Negative	-		Salmonella	012314-05	Carne de pollo
5		133	Positive	+	23,57	Salmonella	012314-05	Carne de pollo
6		134	Positive	+	23,04	Salmonella	012314-05	Carne de pollo
7		135	Positive	+	24,53	Salmonella	012314-05	Carne de pollo
8		136	Positive	+	16,96	Salmonella	012314-05	Carne de pollo
9		137	Negative	-		Salmonella	012314-05	Carne de pollo

No	C	Name	Salmonella	Salmonella	Salmonella	Assay	Kit Lot	Description
.			a	Result	Ct		Number	
10		138	Negative	-		Salmonella	012314-05	Carne de pollo
11		139	Negative	-		Salmonella	012314-05	Carne de pollo
12		140	Negative	-		Salmonella	012314-05	Carne de pollo
13		141	Negative	-		Salmonella	012314-05	Carne de pollo
14		142	Positive	+	22,83	Salmonella	012314-05	Carne de pollo
15		143	Positive	+	21,35	Salmonella	012314-05	Carne de pollo
16		144	Positive	+	23,94	Salmonella	012314-05	Carne de pollo
17		c positivo	Positive	+	9,85	Salmonella	012314-05	Carne de pollo
18		c negativo	Negative	-		Salmonella	012314-05	Carne de pollo

**Figura No. 26** Resultados emitidos por GDS correspondientes a corrida 2.

# BIOCONTROL

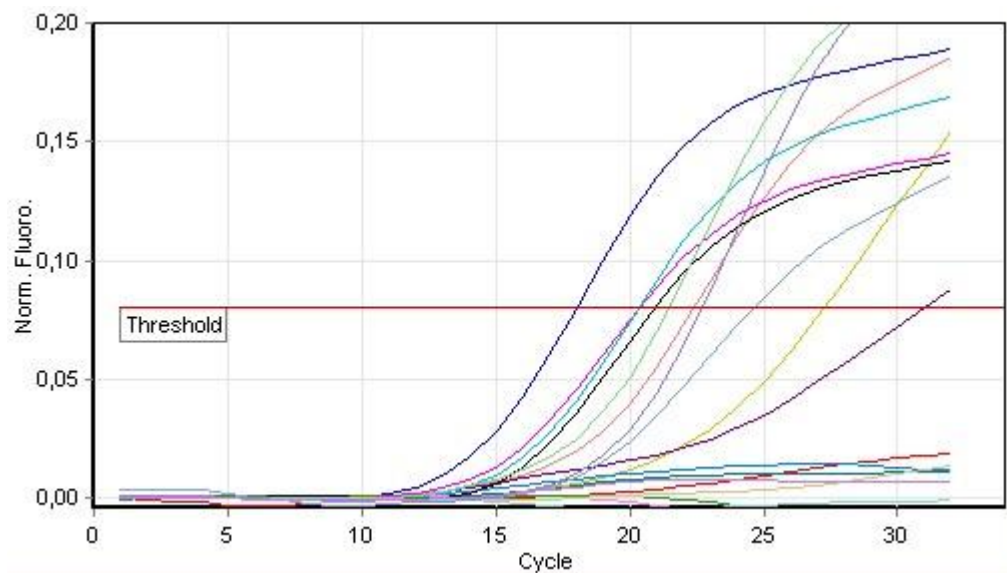
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

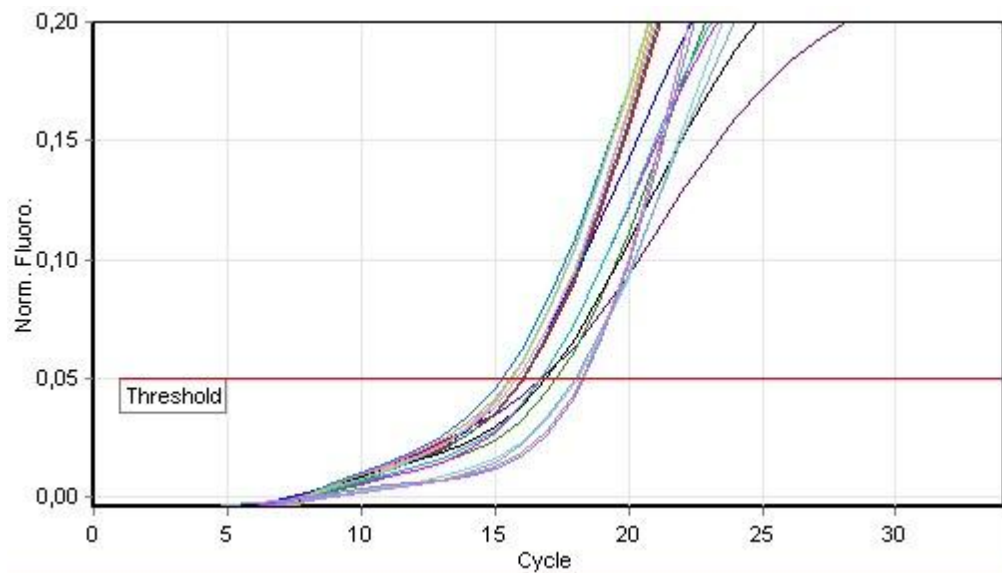
RunName	Salmonella en carne de pollo 2016-10-18 (1)
RunStart	18/10/2016 13:43:57
RunFinish	18/10/2016 15:07:03
Operator	Assurance GDS user
Notes	
RunOn Software Version	Rotor-Gene 1.7.105.1
RunSignature	The Run Signature is valid.

Assay: Salmonella

### Salmonella



## Internal Control



## Salmonella

No	C	Name	Salmonella	Salmonella Result	Salmonella Ct	Assay	Kit Lot Number	Description
1	<span style="color: red;">■</span>	145	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
2	<span style="color: yellow;">■</span>	146	Positive	+	27,26	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
3	<span style="color: blue;">■</span>	147	Positive	+	18,02	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
4	<span style="color: purple;">■</span>	148	Positive	+	31,00	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
5	<span style="color: pink;">■</span>	149	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
6	<span style="color: cyan;">■</span>	150	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
7	<span style="color: teal;">■</span>	151	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
8	<span style="color: orange;">■</span>	152	Positive	+	22,40	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
9	<span style="color: green;">■</span>	153	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo

No	C	Name	Salmonella	Salmonella	Salmonella	Assay	Kit Lot	Description
.			la	Result	Ct		Number	
10		154	Positive	+	20,33	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
11		155	Positive	+	20,91	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
12		156	Positive	+	20,33	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
13		157	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
14		158	Positive	+	21,48	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
15		159	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
16		160	Positive	+	24,59	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
17		control 1	Positive	+	22,71	Salmonella	012314-05	control
18		control 2	Negative	-		Salmonella	012314-05	control

**Figura No. 27** Resultados emitidos por GDS correspondientes a corrida 3.



# BIOCONTROL

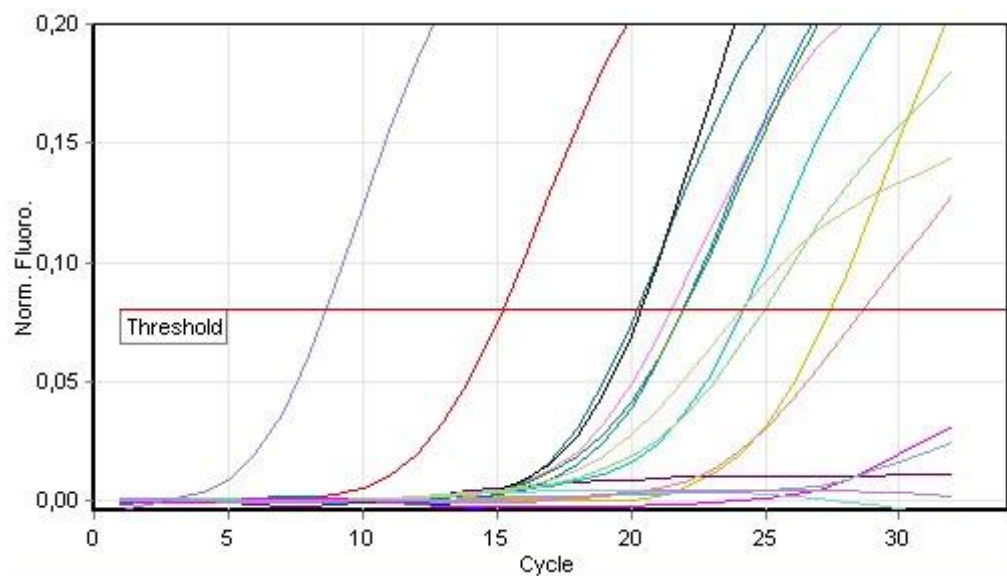
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

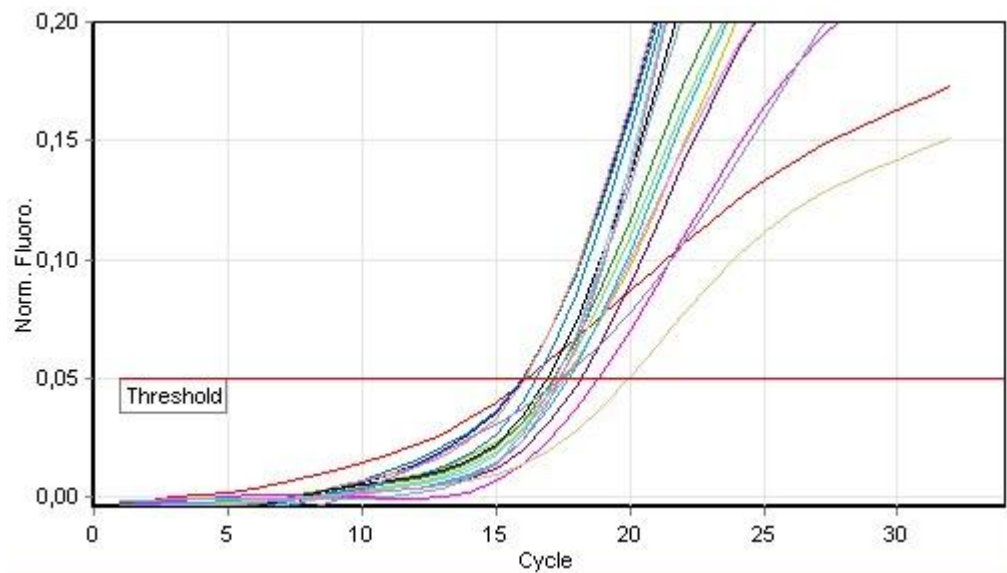
RunName	Salmonella carne de pollo 191015
RunStart	19/10/2016 12:03:35
RunFinish	19/10/2016 13:26:51
Operator	Assurance GDS user
Notes	
RunOn Software Version	Rotor-Gene 1.7.105.1
RunSignature	The Run Signature is valid.

Assay: Salmonella

### Salmonella












## Internal Control



## Salmonella

No.	C	Nome	Salmonella	Salmonella Result	Salmonella Ct	Assay	Kit Lot Number	Description
1	■	161	Positive	+	15,23	Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
2	■	162	Positive	+	27,45	Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
3	■	163	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
4	■	164	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
5	■	165	Positive	+	21,50	Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
6	■	166	Positive	+	21,94	Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
7	■	167	Positive	+	20,22	Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
8	■	168	Positive	+	28,63	Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
9	■	169	Positive	+	21,99	Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca

No	C	Nombre	Salmonella	Salmonella Result	Salmonella Ct	Assay	Kit Lot Number	Description
10		170	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
11		171	Positive	+	20,37	Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
12		172	Positive	+	24,18	Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
13		173	Positive	+	24,09	Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
14		174	Positive	+	24,93	Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
15		175	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
16		176	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
17		c pos	Positive	+	8,65	Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca
18		c neg	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne de pollo fresca

**Figura No. 28** Resultados emitidos por GDS correspondientes a corrida 4.

# BIOCONTROL

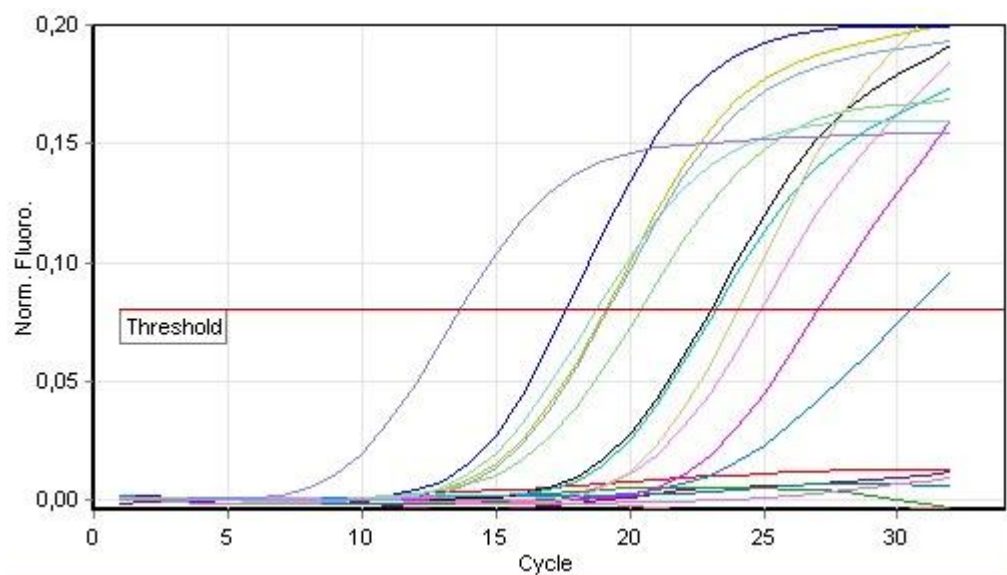
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

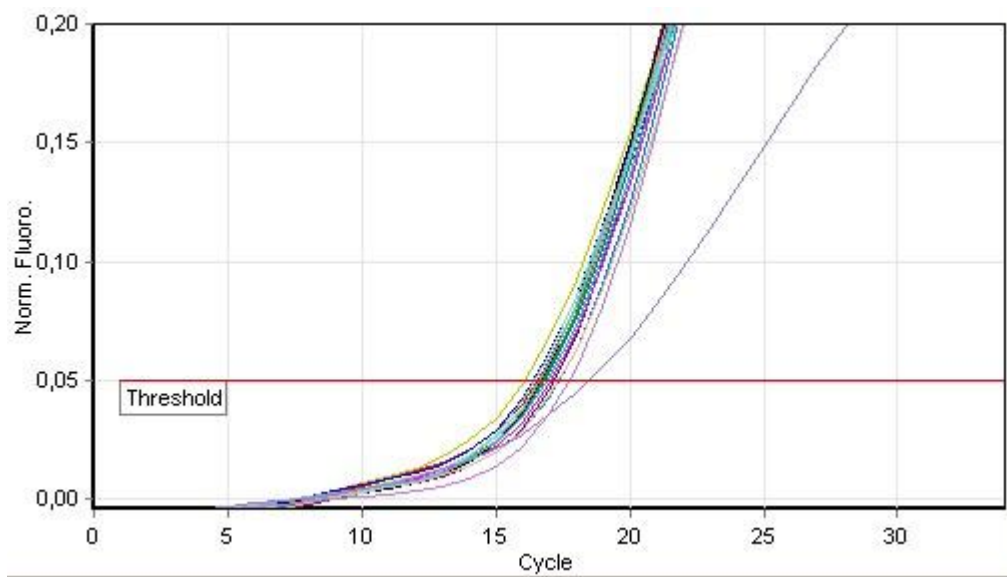
RunName	Salmonella en carne de pollo fresca 2016-10-25
RunStart	25/10/2016 14:13:22
RunFinish	25/10/2016 15:35:56
Operator	Assurance GDS user
Notes	
RunOn Software Version	Rotor-Gene 1.7.105.1
RunSignature	The Run Signature is valid.

Assay: Salmonella

### Salmonella















## Internal Control



## Salmonella

No	C	Name	Salmonella	Salmonella	Salmonella	Assay	Kit Lot	Description
.			la	Result	Ct		Number	
1	<span style="color: red;">■</span>	177	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
2	<span style="color: yellow;">■</span>	178	Positive	+	19,09	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
3	<span style="color: blue;">■</span>	179	Positive	+	17,65	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
4	<span style="color: purple;">■</span>	180	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
5	<span style="color: magenta;">■</span>	181	Positive	+	24,87	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
6	<span style="color: cyan;">■</span>	182	Positive	+	30,54	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo

No	C	Name	Salmonella	Salmonella Result	Salmonella Ct	Assay	Kit Lot Number	Description
7		183	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
8		184	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
9		185	Negative	-		Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
10		186	Positive	+	27,03	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
11		187	Positive	+	23,02	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
12		188	Positive	+	23,19	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
13		189	Positive	+	24,05	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
14		190	Positive	+	20,39	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
15		191	Positive	+	18,74	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
16		192	Positive	+	19,20	Salmonella	012314-05	carne fresca de pollo
17		control 1	Positive	+	13,66	Salmonella	012314-05	control
18		control 2	Negative	-		Salmonella	012314-05	control

**Figura No. 29.** Resultados emitidos por GDS correspondientes a corrida 5.

# BIOCONTROL

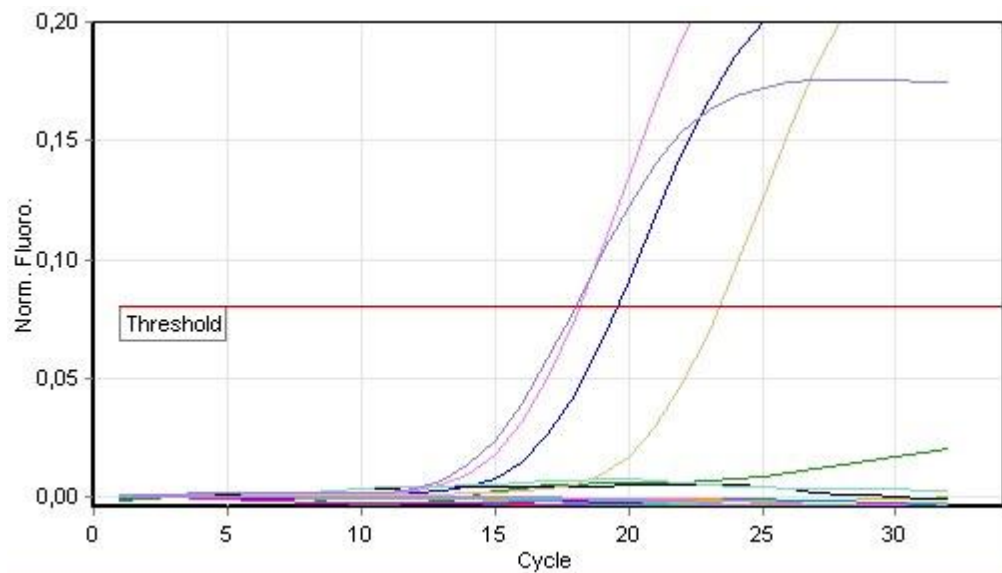
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

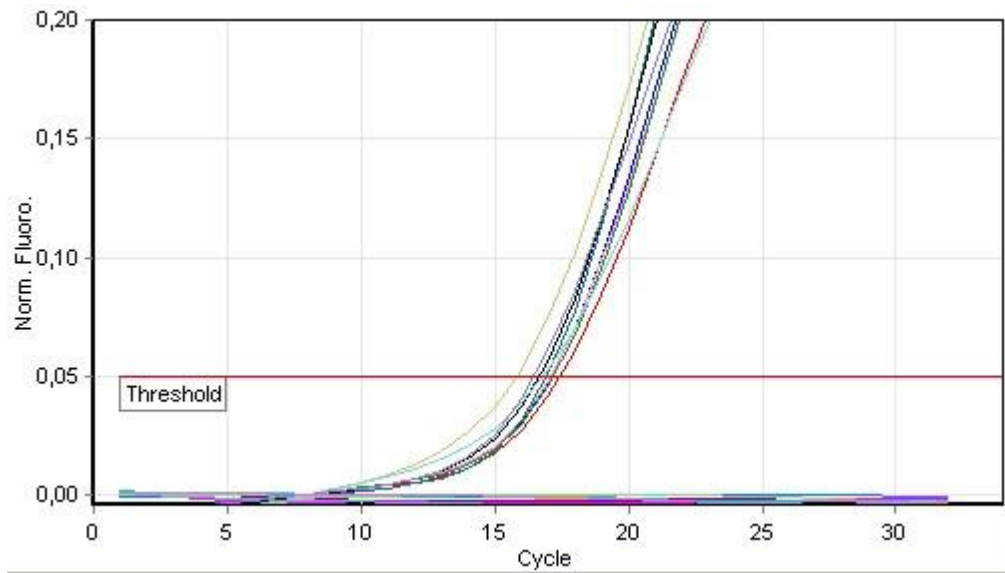
Run Name	salmonella carne de pollo261016
Run Start	26/10/2016 15:55:50
RunFinish	26/10/2016 17:19:42
Operator	Assurance GDS user
Notes	
RunOn Software Version	Rotor-Gene 1.7.105.1
RunSignature	The Run Signature is valid.

Assay: Salmonella

### Salmonella



## Internal Control



## Salmonella

No	C	Name	Salmonella	Salmonella Result	Salmonella Ct	Assay	Kit Lot Number	Description
1	193	193	Negative	-		Salmonella	012314-05	
2	194	194	No Amp	-		Salmonella	012314-05	
3	195	195	Positive	+	19,58	Salmonella	012314-05	
4	196	196	No Amp	-		Salmonella	012314-05	
5	197	197	Positive	+	18,18	Salmonella	012314-05	
6	198	198	No Amp	-		Salmonella	012314-05	
7	199	199	Negative	-		Salmonella	012314-05	
8	200	200	No Amp	-		Salmonella	012314-05	
9	201	201	Negative	-		Salmonella	012314-05	
10	202	202	No Amp	-		Salmonella	012314-05	
11	203	203	Negative	-		Salmonella	012314-05	



No	C	Name	Salmonella	Salmonella Result	Salmonella Ct	Assay	Kit Lot Number	Description
12		204	No Amp	-		Salmonella	012314-05	
13		205	Positive	+	23,40	Salmonella	012314-05	
14		206	No Amp	-		Salmonella	012314-05	
15		207	Negative	-		Salmonella	012314-05	
16		208	No Amp	-		Salmonella	012314-05	
17		cpos	Positive	+	18,01	Salmonella	012314-05	
18		cneg	No Amp	-		Salmonella	012314-05	

**Figura No. 30** Resultados emitidos por GDS correspondientes a corrida 6.

## ANEXO 14

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
OPERATOR <u>Tatiana Burgos y Claudia Alberti</u>		SAMPLE RECORD SHEET											
RUN No <u>5</u>		DATE <u>26/10/16</u>											
A	Cx + kit	Cx - kit	Cx Cold M	33 P	33 M	34 P	34 M	35 P	35 M	36 P	36 M	37 P	37 M
	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
B	37 M	38 P	38 M	39 P	39 M	40 P	40 M	Cx + cepa	Cx - cepa	Cx bolsa			
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-			
C													
D													
E													
F													
G													
H													

**Figura No. 31** Ejemplo de hoja de trabajo correspondiente a inmunoensayo VIA TECRA.

ANEXO 15



MINISTERIO DE SALUD  
LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA



LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGIA  
REGISTRO DE RESULTADOS DE *Salmonella* spp EN CARNE FRESCA DE POLLO

Responsable/ FECHA	Muestra	GDS	TECRA	Caldo Rappaport			Caldo Tetratónico				Biotómicas			Apil ZOE /Rap ID/ Vitek	Observaciones
				XLD	HE	BS	XLD	HE	BS	TSI	LIA	UREA			
ST/160 25/10/10	9/157	-	-	Amanitas y verde con negro	Amorillado y verde musaibul	Cafés	Rosado con centro negro	Verde musaibul	Cafés	+	-	+		Se detecta <i>Salmonella</i>	
ST/160 25/10/10	10/158	+	+	Amanitas y verde con centro negro	Amorillado y verde con centro negro	Cafés y plateados	Verde con centro negro	Verde amorillado	Plateados	+	+	-	Apil ZOE <i>Salmonella</i> spp		
ST/160 25/10/10	11/159	+	+	Amanitas	Amorillado y verde con centro negro	Cafés y plateados	Rosado con centro negro	Verde amorillado y verde con centro negro	Plateados	+	+	-	Apil ZOE <i>Salmonella</i> spp		
ST/160 25/10/10	12/160	-	-	Amanitas musaibul con negro	Amorillado y verde musaibul	Cafés	Amorillado con centro negro	Verde amorillado musaibul	Cafés	+	-	+		Se detecta <i>Salmonella</i>	
ST/160 25/10/10	13/161	+	+	Amanitas y verde con centro negro	Amorillado y verde con centro negro	Plateados y Cafés	Rosado con centro negro	Verde amorillado y verde con centro negro	Plateados y Cafés	+	+	-	Apil ZOE <i>Salmonella</i> spp		
ST/160 25/10/10	14/162	+	+	Amanitas y verde con centro negro	Amorillado y verde con centro negro	Plateados y Cafés	Rosado con centro negro	Verde amorillado y verde con centro negro	Plateados	+	+	-	Apil ZOE <i>Salmonella</i> spp		
ST/160 25/10/10	15/163	-	-	Amanitas con centro negro	Amorillado musaibul	Cafés	Amorillado con negro	Verde amorillado y verde musaibul	Cafés	+	-	+		Se detecta <i>Salmonella</i>	
ST/160 25/10/10	16/164	-	-	Amanitas con centro negro	Amorillado y verde musaibul	Plateados	Amorillado con negro	Verde amorillado musaibul	Cafés	+	-	+		Se detecta <i>Salmonella</i>	
ST/160 25/10/10	Control negativo	-	-	Amorillado	Amorillado	Cafés	Rosado con centro negro	Verde amorillado y verde musaibul	Plateados	+	+	-	Apil ZOE <i>Salmonella</i> spp		

Letas de medias de cultivo: 171016AP17, 171016B, 171016C, 171016D, 171016E, 171016F, 171016G, 171016H, 171016I, 171016J, 171016K, 171016L, 171016M, 171016N, 171016O, 171016P, 171016Q, 171016R, 171016S, 171016T, 171016U, 171016V, 171016W, 171016X, 171016Y, 171016Z.

Figura No. 32 Ejemplo de hoja de datos crudos utilizada.

## ANEXO 16

The screenshot shows an Excel spreadsheet with the following structure:

- Row 1:** Headers for 'RESULTADOS' (columns D-F) and 'INTERPRETACION' (column H).
- Row 2:** Sub-headers for 'Método alternativo 1 GDS' (columns D-E) and 'Método alternativo 2 TECRA' (columns F-G).
- Row 3:** Further sub-headers: 'Presuntivos' and 'Confirmados' under both methods.
- Columns A-C:** 'Correlativo', 'Muestra estudio', and 'Método de Referencia'.
- Columns D-G:** Data for 'Método alternativo 1 GDS' and 'Método alternativo 2 TECRA'.
- Column H:** Formula for 'Método alternativo 1 GDS'.

The formula in column H for row 4 is:  $=SI(SUMA(D4,C4)=2,"VP",SI(D4<C4,"FN",SI(D4>C4,"FP",SI(SUMA(D4,C4)=0,"VN"))))$

$=SI(SUMA(D4,C4)=2,"VP",SI(D4<C4,"FN",SI(D4>C4,"FP",SI(SUMA(D4,C4)=0,"VN"))))$

The screenshot shows an Excel spreadsheet with the following structure:

- Row 1:** Headers for 'RESULTADOS' (columns D-F) and 'INTERPRETACION' (column H).
- Row 2:** Sub-headers for 'Método alternativo 1 GDS' (columns D-E) and 'Método alternativo 2 TECRA' (columns F-G).
- Row 3:** Further sub-headers: 'Presuntivos' and 'Confirmados' under both methods.
- Columns A-C:** 'Correlativo', 'Muestra estudio', and 'Método de Referencia'.
- Columns D-G:** Data for 'Método alternativo 1 GDS' and 'Método alternativo 2 TECRA'.
- Column H:** Formula for 'Método alternativo 2 TECRA'.

The formula in column H for row 4 is:  $=SI(SUMA(F4,C4)=2,"VP",SI(F4<C4,"FN",SI(F4>C4,"FP",SI(SUMA(F4,C4)=0,"VN"))))$

$=SI(SUMA(F4,C4)=2,"VP",SI(F4<C4,"FN",SI(F4>C4,"FP",SI(SUMA(F4,C4)=0,"VN"))))$

**Figura No. 33** Fórmulas generadas en Excel para asignación de parámetros.

## ANEXO 17

101	PARAMETROS	METODO EVALUADO	
		GDS	TECRA
103	Verdaderos Positivos (VP)	=CONTAR.SI(GDS,"VP")	=CONTAR.SI(TECRA,"VP")
104	Verdaderos Negativos (VN)	=CONTAR.SI(GDS,"VN")	=CONTAR.SI(TECRA,"VN")
105	Falsos Negativos (FN)	=CONTAR.SI(GDS,"FN")	=CONTAR.SI(TECRA,"FN")
106	Falsos Positivos (FP)	=CONTAR.SI(GDS,"FP")	=CONTAR.SI(TECRA,"FP")
107	TOTAL	=SUMA(B103:B106)	=SUMA(C103:C106)

Chi-square, as defined by McNemar, is:  $\chi^2 = \frac{(|a-b|-1)^2}{a+b}$

CHI GDS	=ABS((B106-B105)-1)*EXP(2)/(B105+B106)
CHI TECRA	=ABS((C106-C105)-1)*EXP(2)/(C105+C106)

108				
109	Sensibilidad	=(B103)/(B103+B105)	=(C103)/(C103+C105)	=B109*100 =C109*100
110	Especificidad	=B104/(B104+B106)	=C104/(C104+C106)	=B110*100 =C110*100
111	Tasa FP	=B106/(B106+B104)	=C106/(C106+C104)	=B111*100 =C111*100
112	Tasa FN	=B105/(B105+B103)	=C105/(C105+C103)	=B112*100 =C112*100
113				

**Figura No. 34** Ejemplos de cálculos realizados para determinar valor de parámetros evaluados.

## ANEXO 18

### Procedimiento Assurance GDS System muestras diversas

#### **Preparación de la muestra y pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo para muestras diferentes a pollo fresco.**

Para **mariscos crudos**. Agregar 25 g de muestra en 225 mL de AP 1% con novobiocina.

Para **leche en polvo descremada**. Agregar 25 g de muestra en 225 mL de solución de verde brillante.

**Enjuague de carcasa de pollo.** Drenar asépticamente el exceso de fluido de la carcasa y transferirla a una bolsa estéril grande.

Colocar 400 mL de AP 1% dentro de la cavidad de la carcasa contenida en la bolsa.

Enjuagar el ave completa por dentro y por fuera con un movimiento de vaivén, invirtiendo la bolsa al menos 30 veces, por un minuto. Para hacer esto, mantener la carcasa en el fondo de la bolsa con una mano y con la otra tomar la parte superior de la misma. Este procedimiento asegura que toda la superficie de la carcasa, interior y exterior, sea enjuagada.

Transferir el agua del enjuague a un contenedor estéril.

Transferir los  $(30 \pm 0.6)$  mL del enjuague a una bolsa de plástico estéril y adicionarle  $(30 \pm 0.6)$  mL de AP 1%. Homogenizar en Stomacher aproximadamente por 2 minutos o agitar fuertemente de forma manual.

**Otros alimentos:** Pesar asépticamente 25 g o medir 25 mL de muestra y mezclar con 225 mL de Agua peptonada 1%.

- Homogenizar en Stomacher por 30 segundos e incubar a (35-37) °C por 18 h-24 h. Para leche en polvo descremada, incubar las muestras por 24 h a (35-37) °C.

### **Realización del método de Screening Assurance GDS *Salmonella***

**NOTA:** *Cambiar los guantes previo al manejo de reactivos.*

- Agitar en Vortex el **Reactivo de Concentración**. De esta manera las partículas quedan suspendidas en forma homogénea para ser dispensadas. Inmediatamente transferir 20µL a cada pocillo (tiras de 8 unidades), de acuerdo al número de pruebas a realizar (1 pocillo/muestra). Utilizar una pipeta repetidora y puntas de 0.5 mL. Cubrir los pocillos con una tira de película adhesiva para proteger el contenido.

### **Realización del método de Screening Assurance GDS *Salmonella***

- *Para muestras con baja carga microbiana:* Transferir 1.0 mL de **Solución de lavado** a pocillos de muestra adicionales (1 pocillo/muestra) utilizando una pipeta repetidora con puntas estériles de 10 mL.
- *Para muestras con carga microbiana alta y leche descremada en polvo:* Dispensar 0.5 mL de BHI en un pocillo del bloque de muestras (1 pocillo/muestra). Cubrir los pocillos con una tira de película adhesiva para proteger el contenido y reservar para la siguiente etapa. Utilizar una pipeta repetidora con puntas estériles de 10 mL para la dispensación.
- Cuidadosamente remover la película adhesiva de los pocillos que contienen el reactivo de concentración y adicionar 1 mL de la muestra incubada en AP 1%. La muestra no debe tener partículas suspendidas. Se deben cubrir los pocillos con una película adhesiva diferente a medida se vaya adicionando la muestra.

- Inmediatamente regresar las muestras en el caldo de pre-enriquecimiento (AP 1%) a la incubadora.
- Agitar mediante Vortex la placa aproximadamente 900 rpm durante (10-20) minutos.
- Pasado el tiempo de agitación, cuidadosamente retirar y descartar las películas adhesivas que cubren los pocillos de las muestras y los pocillos del caldo BHI.
- Para todas las muestras, cargar las puntas para PickPen en la pipeta Pickpen, asegurándose de que las puntas estén firmemente en su lugar (mangas acarreadoras). Extender los imanes de la PickPen insertar las puntas en los pocillos de las muestras, agitar suavemente durante 30 segundos mientras se mueve continuamente hacia arriba y abajo desde la superficie hasta el fondo del pocillo. Golpear suavemente la punta Pickpen contra un borde de los pocillos para eliminar el exceso de gotas de la muestra.
- Transferir la PickPen a los pocillos de muestra correspondientes conteniendo BHI. Con las puntas de la PickPen sumergidas retraer los imanes y agitar suavemente. Cubrir los pocillos con una nueva tira de papel adhesivo.
- Incubar los pocillos por (2-4) horas a (35-37) °C.
- Antes que finalice el periodo de incubación, dispensar 45µL de **Buffer de resuspensión** en la microplaca de resuspension de acuerdo al número de pruebas a realizar. Cubrir con una película adhesiva protectora.
- Una vez terminada la incubación transferir las partículas contenidas en BHI haciendo uso de la PickPen a los pocillos de microplaca de resuspensión que contienen el **buffer de resuspensión**. Cubrir con la película adhesiva.

**NOTA:** *Cambiar los guantes nuevamente.*

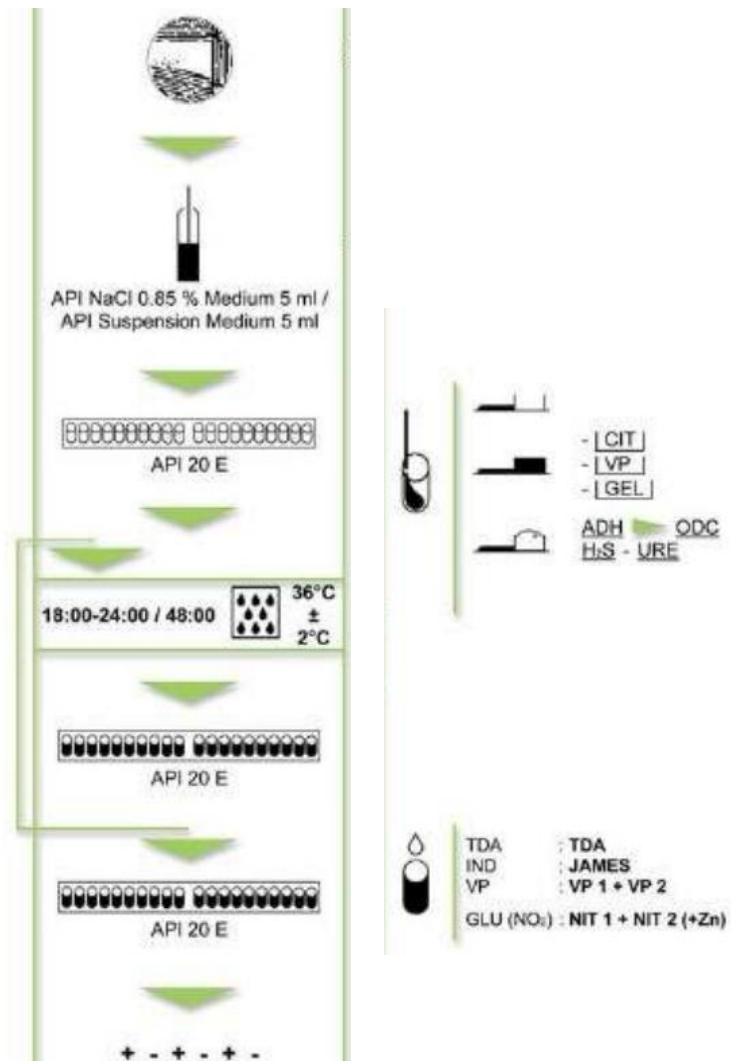


- Sacar del congelador el bloque de frío de gel .
- Retirar de la bolsa de aluminio los tubos de amplificación y colocarlos rápidamente en el bloque frío en gel
- Transferir 30 $\mu$ L de la muestra contenida en el buffer de resuspensión a cada tubo de amplificación. Evitar el arrastre de burbujas.
- Cerrar bien los tubos.
- Antes de colocar los tubos en el rotor, invertir la placa con un brusco movimiento, verificando que se vea el contenido del vial en la tapa.

## **ANEXO 19**

### **Identificación bioquímica de enterobacterias por el sistema API 20E**

1. Estriar la cepa de interés en Agar Tripticasa soya, e incubar por  $24 \pm 2$  horas. Efectuar la prueba de la oxidasa. En caso de ser negativa proceder como sigue:  
  
Suspender el crecimiento obtenido en 5 mL de solución salina al 0.85% (P/V) (NaCl 0.85 %).
2. Proceder a inocular el sistema API 20E de acuerdo con la siguiente metodología:
  - 2.1 Llenar el tubo y la cúpula de las pruebas CIT, VP, GEL con la suspensión bacteriana.
  - 2.2 Llenar los tubos pero no las cúpulas de las demás pruebas.
  - 2.3 Llenar la cúpula de las pruebas ADH, LDC, ODC, URE y H<sub>2</sub>S con aceite mineral estéril para obtener atmósfera de anaerobiosis.
  - 2.4 Incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 18 a 24 h.
  - 2.5 Realizar la lectura de los pocillos negativos y los positivos. Ingresar resultados en el software APIWeb.



**Figura No. 35** Esquema de inoculación de prueba API 20E.

# Comparación de métodos rápidos (screening) Assurance GDS System y de Inmunoensayo VIA TECRA contra el método horizontal para la detección de *Salmonella spp.* (ISO 6579:2002, IDT) en carne de pollo fresca, provenientes de supermercados del área metropolitana de San Salvador.

Claudia Lissette Alberti Arroyo <sup>1</sup>, Jessica Tatiana Burgos Sierra <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Nacional de Referencia, Instituto Nacional de Salud del Ministerio de Salud.

## RESUMEN

Uno de los patógenos que posee mayor incidencia en brotes a nivel mundial y cuyo control es uno de las principales preocupaciones en salud pública es *Salmonella spp.*, una enterobacteria, cuya detección por métodos convencionales de cultivo, conlleva una espera de 5 a 7 días para determinar su presencia en un determinado alimento, razón por la cual, utilizar nuevas metodologías, que garanticen resultados confiables en tiempos más cortos, es una búsqueda constante. Este trabajo se fundamentó en la necesidad de comparar el desempeño de dos métodos alternativos para la detección de *Salmonella spp.*: el método de PCR Assurance GDS System, y el inmunoensayo VIA TECRA, que es una prueba de ELISA, contra el método horizontal para la detección de *Salmonella spp.* ISO 6579:2002, IDT, el cual es un método de cultivo convencional, considerado de referencia. Se analizaron 96 muestras de carne fresca de pollo, proveniente de supermercados del área metropolitana de San Salvador. Cada corrida de análisis estuvo constituida por 16 muestras, que se analizaron en simultáneo por los 3 métodos evaluados, se realizaron los cálculos respectivos de los parámetros en estudio: Sensibilidad, Especificidad, Tasa de Falsos Positivos, Tasa de Falsos Negativos y Chi cuadrado descrito por McNemar. Los resultados derivados del estudio, indicaron que el método alternativo inmunoensayo VIA TECRA, obtuvo los mejores resultados con un 88% de Exactitud Relativa y Sensibilidad, un 86% de Especificidad, 14% de Tasa de Falsos Positivos y un 12% de Tasa de Falsos Negativos, mientras que el Assurance GDS System alcanzó una Exactitud Relativa del 83%, 85% de Sensibilidad, un 81% de Especificidad, 19% de Tasa de Falsos Positivos y un 15% de Tasa de Falsos Negativos. Tanto al realizar el análisis de datos discordantes como al aplicar el test de Chi cuadrado, se determinó que no existe diferencia significativa entre los métodos evaluados ( $P \leq 0.05$ ).

**Palabras clave:** *Salmonella spp.*, Comparación de métodos, carne fresca de pollo, PCR, Inmunoensayo visual.

## INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes y ampliamente extendidas es, la Salmonelosis, causada por la bacteria *Salmonella*. Se estima que afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones <sup>(6)</sup>. En El Salvador, según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (VIGEPES) se han registrado 2, 140,549 casos de diarreas, gastroenteritis y 3,073 casos de fiebre tifoidea. Para el presente estudio se

evaluó la carne fresca de pollo, por considerarse una de las fuentes principales de salmonelosis humana son los productos avícolas según la Unión Europea (UE), <sup>(3)</sup>. Es deseable que los métodos para la detección de *Salmonella* posean la sensibilidad suficiente para detectar una célula del microorganismo en una muestra definida. <sup>(5)</sup> Los métodos convencionales conllevan de 4-6 días para la detección y la identificación de *Salmonella spp.*, es por ello que se han desarrollado procedimientos alternativos para la identificación de bacterias. Proporcionando respuestas más rápidas y oportunas. Lo cual resulta de

**Correspondencia:** [clalberti@gmail.com](mailto:clalberti@gmail.com),  
[jtatiburgos@gmail.com](mailto:jtatiburgos@gmail.com)

mucha utilidad en especial, cuando se trata de detectar un patógeno involucrado en Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) <sup>(7)</sup>. Por lo que, demostrar que los métodos rápidos son comparables a los métodos tradicionales y por tanto, que cumplen con el fin previsto de análisis, es una de las grandes oportunidades de mejora en los procesos de respuesta oportuna, frente a eventos que pongan en riesgo la salud de la población.

El objetivo de este estudio fue comparar según los parámetros establecidos en la Norma ISO 16140:2003 y la Guía para validación de métodos de análisis microbiológicos de alimentos cualitativos y cuantitativos de la AOAC, dos métodos rápidos, los cuales son, el Assurance GDS *Salmonella* y el inmunoensayo VIA TECRA *Salmonella* contra el método horizontal para la detección de *Salmonella spp.* (ISO 6579:2002, IDT) en carne fresca de pollo; el primer método (GDS) combina un paso de separación inmunomagnética (IMS) con un ensayo de detección de Reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real, y el segundo método (VIA TECRA), es un ELISA rápido para discriminación de *Salmonella spp.* en muestras de alimentos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **Muestras de carne fresca de pollo.**

Las muestras fueron obtenidas de establecimientos comerciales pertenecientes a 3 diferentes cadenas de supermercados, ubicados en el municipio de San Salvador y Mejicanos. Se tomaron de dichos supermercados 96 muestras, consistentes en carne fresca de pollo, específicamente, las piezas de muslo-pierna y pechuga, las cuales se analizaron en mismo día de su muestreo. Se recibieron en el Laboratorio, 16 piezas por semana, durante un período de 6 semanas.

### **Preparación de la muestra.**

A partir de cada una de las piezas se pesó asepticamente 25 g de muestra y se mezcló con 225 mL de Agua peptonada 1% (AP 1%), se homogenizaron en Stomacher y se incubaron a 35°C ±2°C de 18-24 horas. Este procedimiento es el mismo, para todos los métodos correspondientes a este estudio.

### **Método convencional, según ISO 6579:2002.** <sup>(4)</sup>

En este método el pre enriquecimiento de la muestra en AP1%, va seguido de un enriquecimiento selectivo en Caldo Rappaport (41.5°C ± 1°C/24 h ± 3 h) y Caldo tetracionato con novobiocina (37°C ± 1°C/24 h ± 3 h). Pasado el período de incubación se realiza el Aislamiento en medio selectivo y diferencial, estriando un inóculo tomado a partir de los caldos selectivos, en Agar XLD, HE y BS, los cuales se incubaron durante (24 ± 2) h, a (35 + 2) °C. Se aislaron colonias con aspecto típico de *Salmonella* de cada uno de los medios selectivos utilizados y se inocularon cada colonia en Agar TSI, LIA y caldo urea, incubados por (24 ± 2) h a (35 + 2) °C. De ser positiva la prueba TSI, LIA y urea, se complementó la identificación con pruebas de identificación bioquímica comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (API 20E).

### **Método Screening Assurance GDS System** <sup>(2)</sup>

Una vez culminada la incubación de la etapa de pre enriquecimiento, se tomó 1 mL de la muestra en AP1% y se colocó en los pocillos que contenían el reactivo de concentración, utilizando una pipeta multicanal (Pickpen) se transfirió la muestra a través de la solución de lavado a los pocillos con BHI, se incubaron los pocillos

por (2-4) horas a (35-37) °C. Pasado el lapso de incubación, con la pipeta multicanal se transfirieron las partículas contenidas en BHI a las placas con buffer de resuspensión. Luego, se procedió a la amplificación y detección del microorganismo en estudio, en el equipo automatizado Rotor Gene GDS. Si el resultado era negativo el análisis finalizaba en esta etapa. Para las muestras positivas, se siguió el procedimiento a partir de la muestra en AP1% como lo indica el método convencional, para las fases de: Enriquecimiento en Caldo, Aislamiento e identificación, confirmación bioquímica.

#### **Método screening Inmunoensayo visual VIA TECRA *Salmonella***<sup>(1)</sup>

La muestra pre enriquecida, se transfirió a los caldos selectivos Rappaport (42°C ± 0.2°C/24 h ± 2 h) y Tetracionato (43°C ± 0.2°C/24 h ± 2 h). Se tomó 1 mL de cada cultivo y se transfirieron a 2 tubos con Caldo M, respectivamente. Se transfirieron 0.5 mL de cada uno de los enriquecimientos en Caldo M (para un volumen de 1 mL en total) a un tubo con tapón de rosca para su calentamiento en agua hirviendo por (10-15) min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió a transferir 0.2 mL de cada una de las muestras hervidas previamente, a los respectivos pocillos para posterior realización del inmunoensayo, que requirió de un primer lavado, adición del conjugado, segundo lavado, adición del substrato y finalmente, se comprobó el color de los pocillos contra la carta del color propia del kit utilizado.

Las muestras presuntivas positivas, se confirmaron por estriado del cultivo proveniente de los Caldos Rappaport, Caldo tetracionato y Caldo M, en Agar HE, XLD y BS. Las colonias típicas o

sospechosas obtenidas, fueron confirmadas según el método convencional.

#### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos crudos obtenidos se realizó mediante el programa Excel 2010, donde utilizando como guía los parámetros establecidos en la ISO 16140:2003 se calculó la Exactitud Relativa, Sensibilidad, Especificidad, Tasa de falsos positivos, Tasa de falsos negativos.

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los métodos alternativos evaluados y el Método convencional, se utilizó el análisis de datos discordantes y prueba de McNemar (una prueba de Chi cuadrado  $\chi^2$ ), la cual establece que la proporción de positivos confirmados por el método alternativo no debe ser estadísticamente diferente de la proporción de positivos confirmados por el método de referencia.

#### **RESULTADOS Y DISCUSION.**

El método convencional ISO 6579:2002, fue capaz de detectar al patógeno en estudio en 59 de las 96 muestras analizadas, lo que equivale a un 61% de positividad, siendo por tanto, una demostración experimental que el microorganismo *Salmonella spp.*, puede encontrarse en la carne fresca de pollo, siendo este un reservorio adecuado para su crecimiento y multiplicación.

Además se evidencia la idoneidad del método convencional, debido a que, aún en presencia de múltiple flora propia de la matriz en estudio, el método es capaz de detectar a *Salmonella spp.*

Respecto al método molecular Assurance GDS System, de las 96 muestras procesadas, se obtuvo un porcentaje de

positividad del 59%, es decir 57 de 96 muestras proporcionaron un resultado positivo al patógeno en estudio; mientras que el 41% restante, equivalente a 39 de 96 muestras, resultaron ser negativas a *Salmonella spp.* Cabe destacar que los porcentajes anteriormente mencionados, se encuentran muy cercanos a los determinados por el método convencional, tomado como de referencia.

El inmunoensayo VIA TECRA, muestra un porcentaje de positividad del 59%, es decir 57 de 96 muestras dieron resultado positivo al patógeno en estudio; mientras que el 41% restante, equivalente a 39 de 96 muestras, resultaron ser negativas a *Salmonella spp.*

Cabe destacar que tanto el método Assurance GDS System y el inmunoensayo VIA TECRA, emiten resultados presuntivos, que deben confirmarse mediante el método convencional. Por ello algunas muestras difieren entre el resultado presuntivo y el confirmado. Lo que conlleva al cálculo de los parámetros de desempeño del método; Exactitud Relativa, Sensibilidad, Especificidad, Tasa de Falsos Positivos, Tasa de Falsos Negativos, análisis de datos discordantes y Chi cuadrado de McNemar, cuyos resultados se detallan más adelante.

### Comparación de los métodos en estudio

En la Tabla I se muestra el recuento general de cada uno de los elementos que permiten evaluar los métodos Assurance GDS System e inmunoensayo VIA TECRA, contra el método de cultivo convencional. Se observa que, el método de inmunoensayo VIA TECRA, posee mayor cantidad de Verdaderos Positivos (52) y Verdaderos Negativos (32), y una menor cantidad de Falsos Negativos (7) y Falsos Positivos (5), contra lo correspondiente al Assurance GDS System.

Respecto al método alternativo 1, Assurance GDS System, obtuvo un 85% de sensibilidad, es decir; la capacidad que posee este método de asignar correctamente una muestra positiva, en el análisis presuntivo, corresponde a un 85%. Cabe destacar, que los métodos de tipo molecular, se ven afectados por diversas características propias de la matriz, como la presencia de inhibidores, grasa propia de la muestra, etc, lo que puede generar cierto nivel de interferencia al momento de realizar los análisis.

La positividad de la PCR depende de muchos factores intrínsecos de su naturaleza, y los resultados que se obtengan pueden depender de la prevalencia del microorganismo, de la presencia de cepas invasivas de *Salmonella spp.* en los alimentos estudiados y de las características de las diferentes matrices analizadas.

El inmunoensayo VIA TECRA, muestra una Exactitud Relativa del 88%, reportando un 5% mayor a lo emitido por GDS, una tasa de Sensibilidad, del 88%, un 3% más alta, comparado con GDS, lo que implica una mayor capacidad para detectar a *Salmonella spp.* en la carne fresca de pollo.

Tabla I. Valores de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos negativos, falsos positivos, tasa de falsos positivos y negativos, sensibilidad, especificidad y Chi cuadrado a partir de las muestras analizadas con los diferentes métodos.

PARAMETROS	METODOS EVALUADOS	
	ASSURANCE GDS	VIA TECRA
Verdaderos Positivos (VP)	50	52
Verdaderos Negativos (VN)	30	32
Falsos Negativos (FN)	9	7
Falsos Positivos (FP)	7	5

PARAMETROS	METODOS EVALUADOS	
	ASSURANCE GDS	VIA TECRA
Tasa de falsos positivos (%)	19	14
Tasa de falsos negativos (%)	15	12
Exactitud Relativa (%)	83	88
Sensibilidad (%)	85	88
Especificidad (%)	81	86
Chi <sup>2</sup> McNemar	0.0625	0.083

Los resultados referidos a la Especificidad, nos muestran al inmunoensayo VIA TECRA con un 86%, mientras que Assurance GDS System, con un 81%, teniendo por tanto, un mejor desempeño el inmunoensayo. Se atribuye el 100% al método convencional, siendo este la referencia.

El método Assurance GDS System, posee una tasa de falsos positivos del 19%, valor que supera al 14% calculado para el inmunoensayo VIA TECRA.

Este parámetro nos permite estimar, en qué medida el método nos provee una respuesta positiva en la etapa presuntiva, que resulta ser negativa, al confirmar por métodos convencionales de cultivo. Hecho que afecta en razón de costos, ya que estos se ven aumentados, al sugerir muestras con resultados presuntivos positivos, que deben pasar a la etapa confirmativa. El porcentaje relativamente alto de falsos positivos, también puede deberse a la elevada carga de la flora acompañante en las muestras.

La tasa de falsos negativos, para el método molecular Assurance GDS System, posee el valor más alto, correspondiente a este

parámetro, obteniendo un 15% de falsos negativos, contra un 12% del inmunoensayo VIA TECRA. Resultados un tanto preocupantes, debido a que, existe una posibilidad de liberar muestras de alimentos (12-15)% “presuntivamente negativas”, que al seguir el método convencional, son “confirmadas positivas”, lo que genera que una proporción de las muestras que poseen al patógeno, no sean detectadas mediante los métodos alternativos evaluados.

El test de significancia aplicando Chi cuadrado, descrito por McNemar, es una prueba que establece que la proporción de presuntivos confirmados por el método alternativo, no es estadísticamente diferente a la proporción de positivos confirmados por el método de referencia, para cada tipo de alimento. Por lo que los resultados planteados, solo corresponden a carne fresca de pollo.

Este parámetro planteado por McNemar, debe generar un resultado <3.84 para indicar que la proporción de positivos por el método alternativo y por el método de referencia, no son estadísticamente diferentes con un nivel de 5% de significancia.

El resultado obtenido a través de este estudio aporta un valor de 0.0625, el cual es menor a 3.84, cumpliendo así con este criterio. De esta manera podemos considerar que no existen diferencias significativas, entre los métodos, Assurance GDS System y cultivo convencional, con un nivel de significancia del 5%.

El valor de Chi cuadrado descrito por McNemar, para el inmunoensayo VIA TECRA, fue de 0.083. Lo que implica que no existen diferencias significativas, entre VIA TECRA *Salmonella* y el cultivo



convencional, con un nivel de significancia del 5%.

### **CONCLUSIONES.**

Por medio de esta investigación se ha logrado demostrar experimentalmente que, la carne fresca de pollo, es un reservorio comprobado del patógeno *Salmonella spp*, ya que fue posible su detección, mediante los tres métodos ensayados, Assurance GDS System y VIA TECRA en un 59% de las muestras y en el cultivo convencional en un 61%. Sí mismo, se evidencia que la carne fresca de pollo, constituye una matriz de alta complejidad, ya que posee una gran cantidad de flora acompañante e interferente para su aislamiento.

Como se planteó en los análisis de resultados, al evaluar la cantidad de muestras correctamente asignadas como positivas al patógeno en estudio, en el análisis presuntivo emitido por los métodos alternativos GDS y VIA TECRA, es éste último el que resultó con un porcentaje mayor en la detección de *Salmonella spp* en carne fresca de pollo, ya que el método VIA TECRA obtuvo un 88% de Sensibilidad ante el microorganismo diana, mientras que Assurance GDS System, fue sensible en un 85% de las muestras que mediante el método convencional confirmaron ser positivas para *Salmonella spp*.

Los resultados obtenidos según los parámetros evaluados, muestran que la metodología molecular por PCR (Assurance GDS System) y el inmunoensayo visual (VIA TECRA *Salmonella*) ofrecen una alta sensibilidad y especificidad en la detección de *Salmonella spp*. en la matriz evaluada.

Respecto al test de significancia de McNemar, y el análisis de datos discordantes, se demostró que no existe diferencia significativa entre los métodos Assurance GDS System y el inmunoensayo VIA TECRA, contra el método horizontal

para la detección de *Salmonella spp*. (ISO 6579:2002, IDT) evaluados, con un nivel de significancia  $P \leq 0.05$ . Este criterio es aplicable específicamente para la matriz en estudio, carne fresca de pollo. Por lo que se determina que los métodos en estudio son comparables entre sí.

Es importante enfatizar que, la PCR, así como el inmunoensayo visual, complementa pero no reemplazan las técnicas microbiológicas tradicionales, debido a que los resultados positivos presuntivos deben confirmarse por el método convencional.

### **AGRADECIMIENTOS.**

Los autores agradecen al Instituto Nacional de Salud y al Laboratorio Nacional de Referencia del Ministerio de Salud, por su apreciable apoyo para la realización de los análisis microbiológicos respectivos.

### **REFERENCIAS**

- [1] AOAC Official Method 998.09. Colorimetric screening enzyme immunoassay screening method (TECRA *Salmonella* visual immunoassay)
- [2] AOAC Official Method 2009.03, *Salmonella* in foods and environmental surface. Assurance GDS *Salmonella* method for foods.
- [3] Carrascal AK, Correa DX. (2012). Perfil de riesgo *Salmonella spp* (no tifoideas) en pollo entero y en piezas. Instituto Nacional de Salud de Colombia. Edición 1.
- [4] ISO 6579:2002 IDT. (2008). Microbiología de alimentos de consumo humano y animal —Método Horizontal para la Detección de *Salmonella spp* — Método de Referencia, 1° edición.

- [5] Kyung-Min L. (2015). Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety, Food Control. 47, 264-276.
- [6] Organización Mundial de la Salud. Salmonella no tifoidea. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
- [7] Yanez E. (2008). Determinación de Salmonella spp por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. Infect., 12(4). Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n4/v12n4a03.pdf>
-