



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**“VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO BASADO EN
BACTERIÓFAGOS PARA DETECCIÓN DE *Salmonella spp.* EN
MUESTRAS DEL ÁMBITO ALIMENTARIO”**

Leandro Antonio Cádiz Núñez

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESORA GUÍA: DRA. CONSUELO BORIE POLANCO

Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

SANTIAGO, CHILE

2014



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**“VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO BASADO EN
BACTERIÓFAGOS PARA DETECCIÓN DE *Salmonella spp.* EN
MUESTRAS DEL ÁMBITO ALIMENTARIO”**

Leandro Antonio Cádiz Núñez

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA : DRA. CONSUELO BORIE P.
PROFESORA CONSEJERA : DRA. BETTY SAN MARTIN
PROFESOR CONSEJERO : DR. LUIS IBARRA

SANTIAGO, CHILE

2014

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A mis padres por su apoyo incondicional, por creer en mí y por su gran amor.

A mi pareja de toda la vida, por apoyarme, entenderme, por sus consejos y por confiar siempre en mí.

A mis hermanos, por su apoyo y compañía, siempre estuvieron ahí cuando fue necesario.

A mis profesores, especialmente a mi profesora guía, Consuelo Borie, por su paciencia, ayuda, enseñanza y creen en mí.

A mis amigos y compañeros Francisco, Fernando y Natalia, por esas largas noches de estudio y amistad.

A todas las personas de la Unidad de Bacteriología Pecuaria del SAG, sin ellos nada hubiera sido posible, en especial a la Dra. Irma Acevedo González, por su paciencia y enseñanza.

A todos los que estuvieron y están.

Muchas gracias

MEMORIA DE TÍTULO

“VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO BASADO EN BACTERIÓFAGOS PARA DETECCIÓN DE *Salmonella spp.* EN MUESTRAS DEL ÁMBITO ALIMENTARIO”

"VERIFICATION OF A METHOD BASED ON BACTERIOPHAGES FOR DETECTION OF *Salmonella spp.* IN SAMPLES FROM THE SCOPE FOOD"

Leandro Antonio Cádiz Núñez*

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

RESUMEN

Salmonella corresponde a una de las principales causas de enfermedades gastroentéricas, principalmente por la ingestión de alimentos de origen animal contaminados. Para detectar la presencia de *Salmonella* en alimentos existe el método tradicional y métodos alternativos. El método tradicional es bastante extenso y laborioso, retrasando la obtención de resultados. Los métodos alternativos permiten obtener resultados más rápidamente, aun cuando, deben ser validados y verificados frente a un método tradicional.

Este estudio tiene por finalidad verificar al interior de la Unidad de Bacteriología Pecuaria del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) un nuevo método alternativo denominado VIDAS® UP *SALMONELLA* para la detección de *Salmonella spp.* en dos matrices del ámbito alimentario, como lo son esponja sobre carcasa de bovino y enjuague de carcasa de pollo. Para ello se analizaron, en forma simultánea, 52 muestras de cada matriz por el método alternativo y por el método tradicional, de tal manera de obtener valores de sensibilidad relativa, especificidad relativa y exactitud relativa del método alternativo, y la concordancia entre ambos métodos mediante el índice Kappa.

Para la matriz esponja sobre carcasa de bovino se obtuvo una sensibilidad relativa de 100%, especificidad relativa de 100% y exactitud relativa de 100%. Mientras que en la matriz enjuague de carcasa de pollo los valores fueron de 80,7%, 100% y 90,4% respectivamente. La concordancia alcanzada fue de 1,0 y 0,81 para esponja sobre carcasa de bovino y enjuague de carcasa de pollo respectivamente.

Los resultados permiten concluir que este nuevo método alternativo obtiene criterios muy buenos en comparación con su contraparte tradicional, entregándole a la Unidad de Bacteriología Pecuaria una nueva herramienta de análisis.

Palabras claves: *Salmonella spp.*, verificación, método alternativo, bacteriófagos.

ABSTRACT

Salmonella is one of the main causes of gastro-enteric diseases, mainly by the ingestion of food contaminated animal. To detect the presence of *Salmonella* in food there is the traditional method and alternative methods. The traditional method is quite extensive and laborious, delaying the results. The alternative methods to obtain results more quickly, even when, must be validated and verified against a traditional method

This study is designed to check the inside of the Bacteriology Unit of Livestock Agriculture and Livestock Service (SAG) a new alternative method called VIDAS® UP SALMONELLA for the detection of *Salmonella spp.* in two matrices of the area of food, as they are sponge on bovine carcass and chicken carcass rinse. Thus, we analyzed, simultaneously, 52 samples from each array by the alternative method and by the traditional method, so as to obtain values of relative sensitivity, specificity and relative accuracy on the alternative method, and the concordance between the two methods using the kappa index.

For the matrix sponge on bovine carcass was obtained a relative sensitivity of 100 %, relative specificity of 100 % and a relative accuracy of 100 % was obtained. While in the matrix chicken carcass rinses the values were 80.8 %, 100% and 90.4 % respectively. The agreement reached was 1.0 and 0.81 for sponge on bovine carcass and chicken carcass rinse respectively.

The results allow the conclusion that this new alternative method gets criteria very good compared to its traditional counterpart, giving to the Livestock Bacteriology Unit by a new analysis tool.

Keywords: *Salmonella spp* , verification, alternative method, bacteriophages.

INTRODUCCIÓN

La presencia de *Salmonella spp.* en alimentos es una de las principales causas de enfermedades gastroentéricas en la mayoría de los países. En la Unión Europea (U.E.) y en Estados Unidos (EE.UU.) constituye una de las principales causas de intoxicación alimentaria, siendo en ambos casos *Salmonella* Enteritidis el serotipo más prevalente. En Chile la situación es similar con un 58,2% de los casos de Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA) asociados a *Salmonella* durante el año 2013 (semana 50), siendo los serotipos Enteritidis y Typhimurium los más frecuentes.

En cuanto a la detección de *Salmonella spp.* en alimentos existe un método tradicional y diversos métodos alternativos. Se dispone de varias pautas que describen como realizar el método tradicional, una de ellas es la norma ISO 6579:2002 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.*”. Los métodos alternativos permiten obtener resultados más rápidos, sin embargo, éstos deben ser validados y verificados frente a un método tradicional. Entre los métodos alternativos destacan inmunoensayos, inmunoprecipitación, técnicas basadas en amplificación del ADN y enzimoimmunoensayos, entre otros.

En Chile, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) es el organismo encargado de asegurar que los alimentos de origen animal cumplan los requisitos zoonosanitarios para la exportación. En este contexto, la Unidad de Bacteriología Pecuaria del SAG utiliza actualmente un método alternativo inmunoenzimático validado internacionalmente para la detección de *Salmonella spp.* en alimentos, el cual demora al menos 48 horas en obtener resultados. La reciente aparición de un método similar, validado internacionalmente, basado en el uso de proteínas recombinantes de fagos, llamado “VIDAS® UP SALMONELLA” (Biomérieux) ofrece una alternativa de análisis considerablemente más rápida, sin embargo, dado que esta unidad posee calidad de laboratorio oficial, este método requiere ser verificado previamente. Por esta razón, la presente memoria pretende verificar este “kit” comercial al interior de la Unidad de Bacteriología Pecuaria del SAG en dos matrices del ámbito alimentario.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El género *Salmonella* comprende dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* (Su y Chiu, 2007). A su vez *Salmonella enterica* se divide en seis subespecies, siendo desde el punto de vista epidemiológico *Salmonella enterica* subespecie *enterica* la más importante.

El principal modo de transmisión es por la ingestión de alimentos crudos o inadecuadamente cocidos, especialmente los de origen animal, tales como: carnes de ave, cerdo, bovino, huevo, leche y sus derivados (OIE, 2008)

En la U.E. *Salmonella* es un importante productor de enfermedades de transmisión alimentaria, reportándose durante el año 2011 un total de 5.648 brotes, los cuales causaron 69.553 casos humanos, 7.125 hospitalizaciones y 93 muertes. La mayoría de los brotes registrados fueron ocasionados por *Salmonella* (30,5%), siendo el serotipo Enteritidis el más prevalente. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) ha adoptado un enfoque integrado denominado “de la granja a la mesa”, que abarca la seguridad de alimentos y piensos, la nutrición, la sanidad y el bienestar animal y la fitosanidad (EFSA, 2013).

En EE.UU., durante el año 2012 se confirmaron 19.531 casos de ETA, de los cuales 4.563 fueron hospitalizados y 68 tuvieron como resultado la muerte. El número de casos asociados a *Salmonella*, fue de 7.800 (39,9%), siendo el serotipo Enteritidis el más frecuente (18%) (CDC, 2012). El Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos (FSIS, por sus siglas en inglés) es el organismo responsable por la inocuidad del suministro de carnes, aves y huevos en dicho país.

En Chile, en lo que va del año 2013 hasta la semana epidemiológica 50 se han notificado 1.096 brotes de ETA con 7.344 casos. En el 33,9% de los brotes, se logró identificar un agente y de éstos en un 58,2% el agente fue *Salmonella spp.* (MINSAL, 2013).

Dado el carácter ubicuo de *Salmonella* y su rol como causante de ETA en todo el mundo, ocasionando grandes pérdidas económicas, los países importadores plantean diversas exigencias sanitarias para permitir el ingreso de productos de origen animal.

La condición zoonositaria privilegiada que posee Chile le permite exportar diversos productos pecuarios a los más exigentes mercados internacionales, no obstante, la mayoría de estos países sólo permite el ingreso de dichos productos a sus fronteras bajo rigurosas condiciones sanitarias. El SAG es el organismo encargado de asegurar que aquellos productos pecuarios de exportación cumplan con dichos requisitos zoonositarios exigidos por los países importadores de acuerdo a las directrices y normas de los organismos internacionales relacionados con la sanidad animal y la inocuidad de los alimentos. Para esto, el SAG ha desarrollado e implementado el Sistema de Aseguramiento de la Calidad (SAC), el cual contempla una serie de procesos, que van desde el predio hasta que el producto se encuentra listo para su embarque a destino. Uno de estos procesos es el Programa de Reducción de Patógenos (PRP), el cual tiene alcance sobre las plantas faenadoras de exportación, verificando el cumplimiento del SAC a través de la detección de *Salmonella spp.* en productos de origen animal (SAG, 2011). De acuerdo al PRP en cada ciclo de 50 muestras analizadas se permitirá un máximo de siete muestras positivas a *Salmonella spp.* para pollos y pavos, dos muestras para bovinos, ovinos y caprinos y cinco muestras para porcinos (SAG, 2011).

Dado el gran número de casos asociadas a *Salmonella spp.* que se producen año a año, tanto en Chile como en el mundo, es necesario el desarrollo e implementación de métodos de detección de patógenos en las materias primas y productos alimenticios terminados, especialmente los de origen animal, que sean más rápidos, fáciles de utilizar y confiables, de manera de asegurar su calidad e inocuidad, rápida y oportunamente.

1. Métodos de detección de *Salmonella spp.* en alimentos

El método tradicional es referencial y utilizado como “gold standard” para la validación y verificación de métodos alternativos, no obstante, es un método de cultivo extenso y laborioso que retrasa el tiempo de obtención de resultados. A razón de esto, ha surgido el interés por obtener resultados en tiempos considerablemente menores sin perder sensibilidad ni especificidad, para lo cual se han desarrollado métodos más rápidos denominados métodos alternativos (Fung, 2002). Cabe destacar que la Unión Europea

permite su uso sólo si se encuentran validados mediante el protocolo establecido por la norma ISO 16140:2003 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal-Protocolo para la validación de métodos alternativos”.

1.1. Método tradicional

Existen diversas pautas que establecen la forma en que se desarrolla el método tradicional de detección de *Salmonella spp.* en muestras de alimento. En el SAG, uno de los métodos tradicionales que se utiliza es el basado en la norma ISO 6579:2002 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal-Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.*”. según dicha norma el método 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. 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 tres hasta cinco días (ISO 6579, 2002).

1.2. 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 (Jasson *et al.*, 2010).

1.2.1. Método basado en ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Si bien la mayoría de estos métodos alternativos utilizan sustratos cromogénicos para realizar la detección de patógenos, existen otros, basados en la técnica ELFA (del inglés, Enzyme Linked Fluorescent Assay) (Anexo 1). Esta última es una técnica ELISA en "sándwich" de alta sensibilidad y especificidad para la detección de antígenos mediante anticuerpos anti-*Salmonella*, con una lectura final de fluorescencia, proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra (ANÓN, 2012). Un ejemplo de esto es el

método VIDAS[®] EASY *SALMONELLA* (Biomérieux). Este ensayo permite obtener resultados en aproximadamente 48 horas, sin considerar la confirmación de los positivos por un método tradicional. Éste es el actual método alternativo utilizado en la Unidad de Bacteriología Pecuaria del SAG, el cual está validado internacionalmente con valores de especificidad relativa de 99,0%, sensibilidad relativa de 99,1% y exactitud relativa de 99,0% (ANÓN, 2005).

1.2.2. Método basado en bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan y lisan bacterias de manera especie específica, siendo además extremadamente estables a las condiciones ambientales. En las bacterias Gram negativas cualquier proteína, oligosacárido, lipopolisacárido de pared, cápsula, flagelo o pili puede actuar como receptor fágico (Guttman *et al.*, 2005).

Todos los fagos conocidos que reconocen cepas del género *Salmonella spp.* forman parte del orden Caudovirales y son en su mayoría atenuados (Koprinski *et al.*, 2007). Recientemente se ha asociado la tecnología ELFA con una técnica de captura específica mediante fagos para la detección de *Salmonella spp.* en muestras alimenticias, y se ha desarrollado un método llamado VIDAS[®] UP *SALMONELLA* (Biomérieux). Este método utiliza proteínas recombinantes de la fibra de la cola de fagos en reemplazo de los anticuerpos anti-*Salmonella* (ANÓN, 2006). Estas proteínas son capaces de reconocer receptores proteicos de superficie y/o el lipopolisacárido (LPS) específicos de *Salmonella spp.* (ANÓN, 2006). Cabe destacar que los fagos son más sensibles en reconocer estos receptores fágicos que los anticuerpos (ANÓN, 2012). Debido a esto último, con este ensayo es posible obtener resultados de ausencia o presencia de *Salmonella spp.* más rápidamente (18 a 24 horas) en comparación con el método VIDAS[®] EASY *SALMONELLA* (Biomérieux).

1.3. Verificación de un método alternativo

Según la norma 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”. 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 normas 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 (FDA, 2011).

Conforme a la norma 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 a la norma 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 dicha norma (ISO 16140,2003).

Considerando la necesidad de identificar patógenos en productos de origen animal de manera rápida, sencilla y confiable, el objetivo de este estudio es verificar al interior de la Unidad de Bacteriología Pecuaria del Servicio Agrícola y Ganadero un nuevo método alternativo, validado, de detección de *Salmonella spp.* en ciertas matrices del ámbito alimentario de origen animal con el fin de disponer de una nueva herramienta de análisis microbiológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Matrices en estudio

En este estudio se analizaron 104 muestras de dos matrices del ámbito alimentario, pertenecientes al Programa de Reducción de Patógenos (PRP), esponja sobre carcasa de bovino (52) y enjuague de carcasa de pollo (52). La obtención de estas muestras fue realizada de acuerdo al “Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial” por el Médico Veterinario Inspector Oficial del SAG (MVIO) correspondiente a cada planta faenadora (SAG, 2011). De acuerdo a la norma ISO 16140:2003, el 50% de las muestras de cada matriz fueron contaminadas experimentalmente con un cultivo de *Salmonella* Enteritidis, en un volumen de 1.66% en relación al volumen de la muestra. El resto de las muestras se procesaron sin recibir la contaminación experimental.

2. Cepa desafío

Para la contaminación experimental de las muestras se utilizó una cepa de *Salmonella* Enteritidis ATCC® 13076™. Esta cepa pertenece a la colección propia de la Unidad de Bacteriología Pecuaria del SAG.

Como cepas controles positivos en ambos métodos se utilizaron: *Salmonella* H₂S (-), *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™ H₂S (+) y *Salmonella* Enteritidis ATCC® 13076™.

3. Preparación del inóculo para la contaminación artificial

Se preparó un cultivo joven de la cepa seleccionada en 30 mL de agua peptonada tamponada (APT, Difco) de 18 horas de incubación en agitación a 37°C. El título se ajustó en un espectrofotómetro (Turner) a valores de 0,7-0,9 de absorbancia medida a 625 nm, que corresponden a 10⁸ bacterias/ mL. Este inóculo se diluyó al décimo hasta obtener una concentración final entre 5-9 UFC/mL para las muestras de esponja sobre carcasa de bovino y entre 10-20 UFC/ mL para muestras de enjuague de carcasa de pollo. Esta concentración se corroboró mediante recuento bacteriano tradicional.

Una vez preparado el inóculo, las muestras se contaminaron bajo el gabinete de bioseguridad. Todas las muestras, contaminadas y sin contaminar, se procesaron por el método tradicional y por el método alternativo en estudio.

4. Detección de *Salmonella* Enteritidis mediante el Método tradicional

Se usó el método descrito en la norma ISO 6579: 2002 (Anexo 2), según la cual cada muestra de esponja sobre carcasa de bovino y enjuague de carcasa de pollo fue preenriquecida con 50 mL y 30 mL de agua peptonada tamponada (APT) respectivamente e incubada a 37°C +/-1°C durante 16 – 20h. Luego, se realizó la etapa de enriquecimiento en dos medios líquidos selectivos y la etapa de aislamiento, en dos medios sólidos selectivos en placa. De cada medio selectivo sólido, al menos dos colonias típicas de *Salmonella* se identificaron por confirmación bioquímica y serológica.

5. Detección de *Salmonella* Enteritidis mediante el Método alternativo

Todas las muestras fueron analizadas por el “VIDAS® UP *SALMONELLA*” (Biomérieux) de acuerdo a lo indicado por el fabricante (Anexo 3). Cada muestra de esponja sobre carcasa de bovino y enjuague de carcasa de pollo fue enriquecida con 50 mL y 30 mL de agua peptonada tamponada (APT) más 222 µL y 260 µL de suplemento selectivo *Salmonella* respectivamente, e incubada durante 18 a 24h a 41,5°C +/- 1 °C. Luego de esta incubación se transfirió 500 µL de caldo de enriquecimiento al cartucho (incluido en el “kit”) y se inactivó durante 5 +/- 1 minutos utilizando el bloque calefactor VIDAS® Heat and Go (Biomérieux). Previo enfriamiento de los cartuchos, estos se cargaron junto a los conos en el equipo VIDAS® comenzando el análisis que posee una duración aproximada de 48 minutos. Finalmente el equipo automatizado entregó un resultado cualitativo. Todas las muestras positivas por este método fueron sometidas a una confirmación cromogénica rápida. Para ello se sembró 50µL de caldo de enriquecimiento en una placa de agar cromogénico (Biomérieux) incubándola a 37°C +/-1 °C durante 18 a 24h. Las colonias típicas de *Salmonella* fueron confirmadas bioquímica y serológicamente.

6. Bioseguridad

Las normas de bioseguridad adoptadas en este estudio son las establecidas en la Unidad de Bacteriología Pecuaria del SAG para un patógeno como *Salmonella*, que posee Nivel de Bioseguridad II (CONICYT, 2008). Para esto se trabajó siempre en un gabinete de bioseguridad, se utilizó guantes, delantal y cubrecalzado. Se hizo desinfección de las superficies utilizadas con alcohol 70%. Todo el material orgánico de desecho fue incinerado, mientras que el material no desechable fue esterilizado.

7. Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos por ambos métodos y por cada matriz fueron analizados de acuerdo a lo señalado por la norma ISO 16140:2003. Se calculó la concordancia positiva (PA), concordancia negativa (NA), desviación positiva (PD) y desviación negativa (ND) como se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Tabulación de datos y parámetros obtenidos por método tradicional y alternativo

Resultados	Método tradicional positivo (R+)	Método tradicional negativo (R-)
Método alternativo positivo (A+)	Concordancia positiva (PA) (A+/R+)	Desviación positiva (PD) (R-/A+)
Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (ND) (A-/R+)	Concordancia negativa (NA) (A-/R-)

Fuente: norma ISO 16140:2003 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal-Protocolo para la validación de métodos alternativos”.

En base a estos parámetros se determinaron los siguientes criterios comparativos: la sensibilidad relativa (SE), la especificidad relativa (SP) y la exactitud relativa (AC) del método alternativo. Además se calculó la sensibilidad del método tradicional y del método alternativo.

Para obtener la concordancia, es decir, el grado de acuerdo entre los resultados obtenidos por ambos métodos se recurrió al índice Kappa (k), utilizando el software estadístico Minitab®.

Los resultados discordantes fueron analizados de acuerdo a la misma norma. Para ello se empleó el Test de McNemar con la distribución de Chi cuadrado (X^2) con un nivel de significancia de 0,05 y un grado de libertad (ISO 16140:2003).

RESULTADOS

1. Esponja sobre carcasa de bovino

Los resultados obtenidos en las cincuenta y dos muestras de esponja sobre carcasa de bovino analizadas por ambos métodos se detallan en las Tablas 2, 3 y 4.

Tabla 2. Valores obtenidos en las muestras de esponja sobre carcasa de bovino.

Resultados	Método tradicional positivo (R+)	Método tradicional negativo (R-)
Método alternativo positivo (A+)	Concordancia positiva (PA) 26 ¹	Desviación positiva (PD) 0
Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (ND) 0	Concordancia negativa (NA) 26

1. Todas las muestras contaminadas experimentalmente fueron adicionalmente confirmadas como positivas.

Tabla 3. Criterios de comparación en muestras de esponja sobre carcasa de bovino.

Criterio	Valor
Sensibilidad relativa (SE) [100xPA] /PA+ND	100%
Especificidad relativa (SP) [100xNA]/NA+PD	100%
Exactitud relativa (AC) [100x(PA+NA)]/N ¹	100%

Tabla 4. Sensibilidad de cada método para las muestras de esponja sobre carcasa de bovino.

	Método alternativo (PA + PD) / (PA + PD + ND)	Método tradicional (PA + ND) / (PA + PD + ND)
Sensibilidad	100%	100%

Finalmente se obtuvo un índice Kappa igual a uno, indicando una excelente concordancia entre ambos métodos, no hallándose resultados discordantes.

2. Enjuague de carcasa de pollo

Los resultados obtenidos en las cincuenta y dos muestras de enjuague de carcasa de pollo analizadas por ambos métodos permitieron obtener los siguientes resultados expresados en las Tablas 5, 6 y 7.

Tabla 5. Valores obtenidos en muestras de enjuague de carcasa de pollo.

Resultados	Método tradicional positivo (R+)	Método tradicional negativo (R-)
Método alternativo positivo (A+)	Concordancia positiva (PA) 21 ¹	Desviación positiva (PD) 0
Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (ND) 5	Concordancia negativa (NA) 26

1. Todas las muestras contaminadas experimentalmente fueron adicionalmente confirmadas como positivas.

Tabla 6. Criterios de comparación en muestras de enjuague de carcasa de pollo

Criterio	Valor
Sensibilidad relativa (SE) [100xPA] /PA+ND	80,7%
Especificidad relativa (SP) [100xNA]/NA+PD	100%
Exactitud relativa (AC) [100x(PA+NA)]/N ¹	90,4%

Tabla 7. Sensibilidad de cada método para las muestras de enjuague de carcasa de pollo.

	Método alternativo (PA + PD) / (PA + PD + ND)	Método tradicional (PA + ND) / (PA + PD + ND)
Sensibilidad	80,7%	100%

El índice Kappa (k) en esta matriz fue de 0,84, lo que indica una muy buena concordancia entre ambos métodos, aun cuando el método alternativo no detectó cinco de las 26 muestras experimentalmente contaminadas. El análisis de estas muestras discordantes determinó que ambos métodos son equivalentes estadísticamente ($p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) constituyen unos de los problemas de salud pública más extendido en el mundo. Los agentes biológicos son los principales causantes de las ETA, en especial las bacterias, como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, entre otras (EFSA, 2013). Dado que los alimentos de origen animal corresponden al principal modo de transmisión de estos patógenos, la Unión Europea y Estados Unidos, entre otros países, han implementado diversas medidas para disminuir la prevalencia de estos agentes en los animales de abasto, de manera de reducir el riesgo de ETA en la población.

Esto ha generado que las condiciones sanitarias de dichos países, para permitir el ingreso de productos de origen animal a sus fronteras sean cada vez más exigentes, obligando a los países exportadores a aumentar sus estándares de calidad de manera de generar un producto inocuo y de calidad.

Dado el rol garante del SAG en términos de la exportación de productos pecuarios, su Unidad de Bacteriología Pecuaria requiere nuevas metodologías que permitan detectar la presencia de patógenos en productos de origen animal de manera rápida, sencilla, oportuna y confiable. Estas metodologías deben estar validadas internacionalmente por organismos de acreditación internacional y, previa implementación en el laboratorio, deben ser verificadas.

El método alternativo VIDAS[®] UP *SALMONELLA*, en el caso de las muestras de esponja sobre carcasa de bovino demostró valores del 100% de sensibilidad relativa, especificidad relativa y exactitud relativa. Pese a lo anterior, en 6 de las 26 muestras (23%) contaminadas experimentalmente, no se logró su confirmación mediante la técnica cromogénica rápida (Confirmación inicial) por lo que se debió implementar una confirmación adicional, establecida por el fabricante, la cual retrasó la identificación en 48 horas. Esta no detección se podría deber a una contaminación natural con otras enterobacterias como *Proteus spp.* y *Escherichia spp.*, situación que limitaría el crecimiento de *Salmonella* en el agar cromogénico (ChromID[™] *Salmonella*), dado que este medio sólo produce inhibición de

bacterias Gram positivas, levaduras y la mayoría de los organismos Gram negativos no fermentadores (Biomérieux, 2010). Si bien, la variable tiempo en estas seis muestras, no otorga a simple vista una ventaja importante del método alternativo con respecto al método tradicional, es importante considerar que el método tradicional requiere una gran cantidad de material para ser desarrollado y además, necesita de un número importante de analistas en aquellos casos en que el número de muestras sea considerable.

El grado de acuerdo entre ambos métodos en esta matriz es excelente, dado por un valor de Kappa igual a 1, lo que indica que el método alternativo y el método tradicional coinciden totalmente al analizar una misma muestra.

Cabe destacar que los resultados obtenidos en esta matriz son muy semejantes, e incluso levemente superiores a los obtenidos en la validación general de este mismo método (ANÓN, 2011) (Anexo 4).

En el caso de las muestras de enjuague de carcasa de pollo, al momento de realizar la contaminación experimental de las 26 muestras se aumentó la carga del inóculo a 10-20 UFC, ya que en los controles positivos se observó ausencia de crecimiento de la cepa desafío por el método alternativo, situación que no ocurrió por el método tradicional. Probablemente se debió a que este tipo de muestra no presenta un soporte para la multiplicación bacteriana. Por lo anterior se decidió, además de aumentar la concentración bacteriana, agregar al control positivo de esta cepa 30 ml leche estéril, de tal manera de estimular su desarrollo (Ellner, 2000). Con estos cambios se logró el crecimiento bacteriano y su detección por parte del método alternativo.

Los valores de sensibilidad y exactitud relativas para el VIDAS® UP *SALMONELLA* fueron levemente inferiores que aquellos observados en las muestras de esponja sobre carcasa de bovino. La menor sensibilidad (80,7%) podría deberse a la elevada cantidad de grasa que presenta la piel de pollo, siendo ésta uno de los principales factores que puede provocar la inhibición del crecimiento bacteriano. Una muestra con alto contenido de grasa puede interferir con la recuperación de *Salmonella*, ya que estas pueden quedarse retenidas dentro de las micelas lipídicas (Mansfield y Forsythe, 2000). Además, la temperatura de incubación (41,5°C) ayuda a solubilizar las grasas, aumentando con ello el nivel lipídico en

las muestras de enjuague de carcasa de pollo e inhibiendo más aún el crecimiento bacteriano (Carter, 2008).

Si bien la sensibilidad relativa del método alternativo disminuyó en las muestras de enjuague de carcasa de pollo con respecto a las muestras de esponja sobre carcasa de bovino, la especificidad relativa se mantuvo en 100%. Esto último cobra importancia en nuestro país, dado que, durante el año 2012 en el marco del Programa de Reducción de Patógenos, de las 6.231 muestras analizadas sólo 189 (3%) de ellas fueron positivas a *Salmonella spp.* (Acevedo, 2014). Este gran número de muestras negativas en los análisis de rutina le otorga una ventaja sin igual al método VIDAS UP[®] SALMONELLA el cual permite obtener estos resultados en menos de 24 horas.

La concordancia entre ambos métodos, medida por el índice kappa en las muestras de enjuague de carcasa de pollo fue inferior a la obtenida en las muestras de esponja sobre carcasa de bovino, no obstante es considerado aún un valor elevado.

Finalmente, en esta matriz los valores de sensibilidad y exactitud relativa del VIDAS UP[®] SALMONELLA fueron inferiores a los obtenidos en la validación general (ANÓN, 2011) (anexo 4).

En este estudio se demostró con objetividad que el método VIDAS UP[®] SALMONELLA analizado e implementado al interior de la Unidad de Bacteriología Pecuaria, para las dos matrices analizadas, cumple con los requisitos establecidos en la validación para este método, otorgándole a esta unidad una nueva herramienta de análisis microbiológico que permite garantizar la inocuidad de los productos pecuarios de exportación.

En el caso de las muestras de esponja sobre carcasa de bovino, el método alternativo VIDAS UP[®] SALMONELLA demostró ser ciento por ciento sensible, exacto y específico, concordando perfectamente con el método tradicional. Esto le permite a la Unidad de Bacteriología Pecuaria y al Programa de Reducción de Patógenos disponer de un método altamente confiable para la detección de *Salmonella spp.* en menos de 24 horas.

Distinto es el caso de las muestras de enjuague de carcasa de pollo, en donde si bien, el método alternativo demostró ser estadísticamente equivalente al método tradicional, existiendo además una buena concordancia entre ambos, la baja sensibilidad del VIDAS UP[®] *SALMONELLA* en estas muestras le otorga una menor confiabilidad, considerando especialmente la importancia de la labor ejercida por el Servicio Agrícola y Ganadero y su Unidad de Bacteriología Pecuaria garantizando la calidad microbiológica de los productos pecuarios de exportación.

Es importante enfatizar la importancia de verificar y validar métodos que permitan detectar la presencia de patógenos en matrices del ámbito alimentario como las analizadas en este estudio, dado que, las superficies de canales o carcasas son una de las vías de contaminación de alimentos más frecuentes en la industria alimentaria (Kusumaningrum *et al.*, 2003).

BIBLIOGRAFÍA

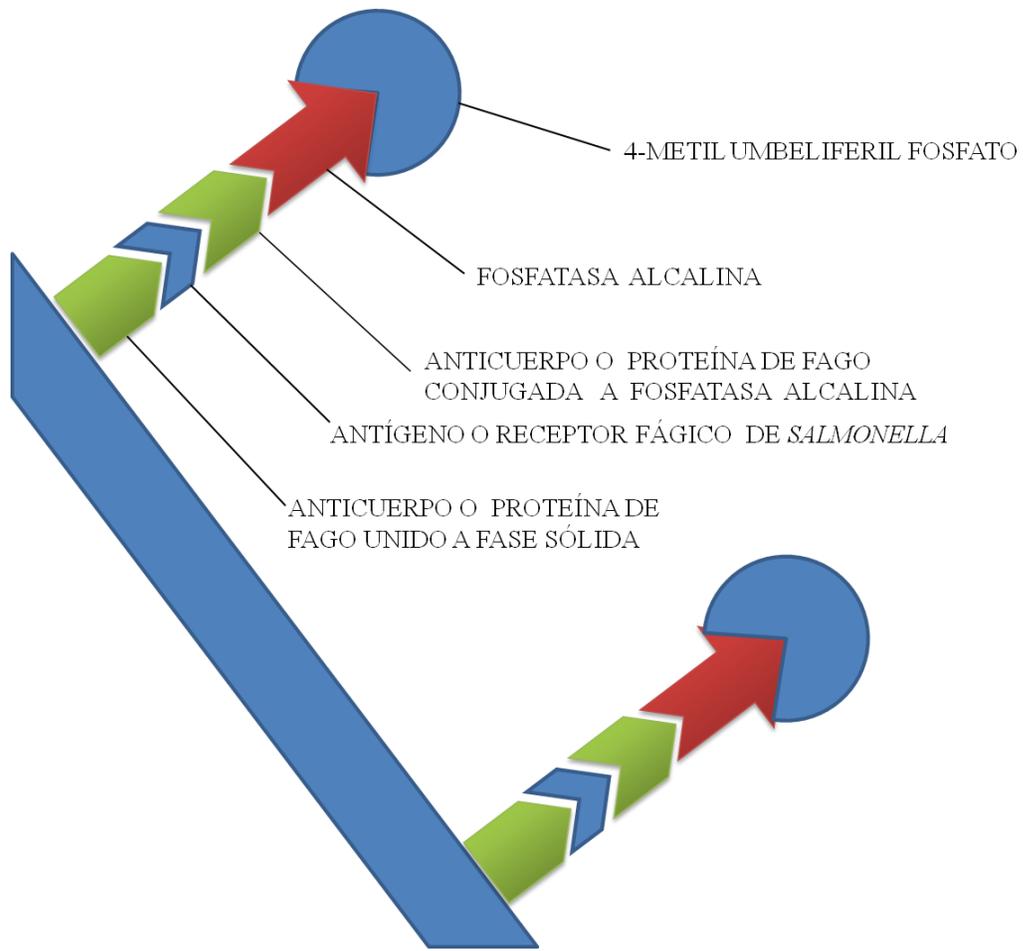
- **ACEVEDO.** 2014. Resultados del Programa de Reducción de Patógenos. Santiago, Chile. 2 de enero 2014. Servicio Agrícola y Ganadero. Comunicación personal.
- **ANÓN.** 2005. AFNOR validation following the EN ISO 16140 standard of the VIDAS Easy Salmonella method BIO 12/16-09/05. Francia.
- **ANÓN.** 2006. Detección e identificación de grupos de bacterias. Oficina española de patentes y marcas. ES.2 263 598. [en línea]<
http://www.oepm.es/pdf/ES/0000/000/02/26/35/ES-2263598_T3.pdf> [consulta: 17-09-2013].
- **ANÓN.** 2011. NF Validation certification of VIDAS® UP *Salmonella* method BIO 12/32 – 10/11. Francia.
- **ANÓN.** 2012. Soluciones automáticas para el control microbiológico de alimentos. [en línea]. Barcelona, España.<<http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/bioMerieux.pdf>> [consulta: 13-09-2013].
- **BIOMÉRIEUX.** 2010. Medio cromogénico para el aislamiento selectivo y la diferenciación del género *Salmonella* en productos alimenticios. [en línea]. Madrid, España.<http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Medios_cromogenicos_bioMerieux.pdf> [consulta: 22-12-2013].
- **CARTER, M.** 2008 Development of a rapid detection method of *Salmonella* spp. on chicken skin real-time polymerase chain reaction. Ph.D. in physiology. Alabama, EE.UU. Auburn University. 102p
- **CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 2012. Multistate Outbreak of *Salmonella* Bareilly and *Salmonella* Nchanga Infections Associated with a Raw Scraped Ground Tuna Product (Final Update). [en línea]. <<http://www.cdc.gov/salmonella/bareilly-04-12/index.html>>. [consulta: 12-10-2013].
- **CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA.** 2008. Manual de normas de bioseguridad. 2ª ed. Santiago, Chile. 139 p.

- **EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY.** 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA Journal 11(4):1-250.
- **ELLNER, R. 2000.** Microbiología de la leche y de los productos lácteos. Preguntas y respuestas. Editorial: Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. 168p.
- **FUNG, D.Y.C.** (2002). Rapid Methods and Automation in Microbiology. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 1: 3-22.
- **FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2011. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods [en línea]<<http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/UCM273418.pdf>> [consulta: 01-10- 2013].
- **GUTTMAN, B.; RAYA, R.; KUTTER, E.** 2005. Basic Phage Biology. pp.29-66 en: Kutter, E., Sulakvelidze, A. (editores). Bacteriophages: Biology and Applications. Florida, EE.UU.
- **ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.** ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding Stuffs-Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Suiza, 2002. 33 p.
- **ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.** ISO 16140. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Protocol for the validation of alternative methods. Suiza, 2003.80 p.
- **ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.** ISO 17025. “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories”. Suiza, 2005. 6p.
- **JASSON, V.; L. JACXSENS.; P. LUNING.; A. RAJKOVIC, AND M. UYTTENDAELE.** 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. Food Microbiology 27: 710-730.
- **KOPRINSKI, A.M.; SULAKVELIDZE,A.; KONCZY,P.; POPPE,C.** 2007.Salmonella Phages and Prophages. Genomics and Practical Aspects. Methods in Molecular Biology, 349: 133-175.

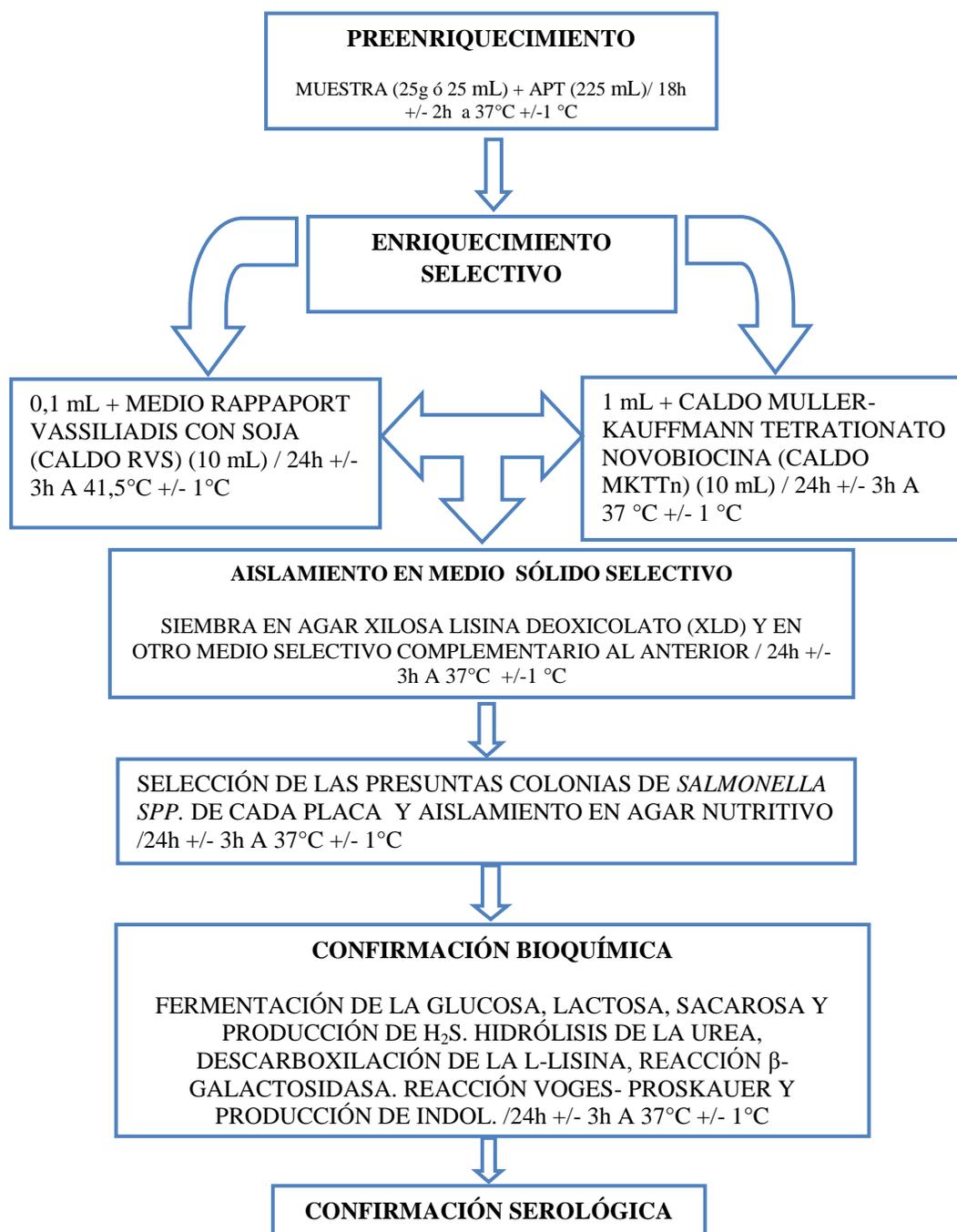
- **KUSUMANINGRUM, H.D., RIBOLDI, G., HAZELEGER, W.C., AND BEUMER, R.R.** 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology* 85, 227-236.
- **MANSFIELD, L. AND FORSYTHE S.** 2000. Detection of Salmonellae in food. *Reviews in Medical Microbiology* 11(1): 37-46.
- **MINSAL. MINISTERIO DE SALUD.** 2013. Situación de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) hasta el 19 de diciembre 2013 (Semana Epidemiológica 1 a 50). [en línea]<
http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Entericas/Informe_entericas_SE502013.pdf>[consulta: 22-12-1013].
- **OIE. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL.** 2008. Manual de la OIE sobre animales terrestres. [en línea] <
http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.09.09.%20Salmonelosis.pdf>[consulta: 02-06- 2013].
- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2011. Programa de Reducción de Patógenos PRP/MP1. Manual de Procedimientos para el Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes Faenadas en Mataderos de Exportación. Chile. 97p.
- **SU, L.H. Y CHIU, C.H.** 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Medical Journal*, 30:210-219.

ANEXOS

Anexo 1. Principio de técnica ELFA

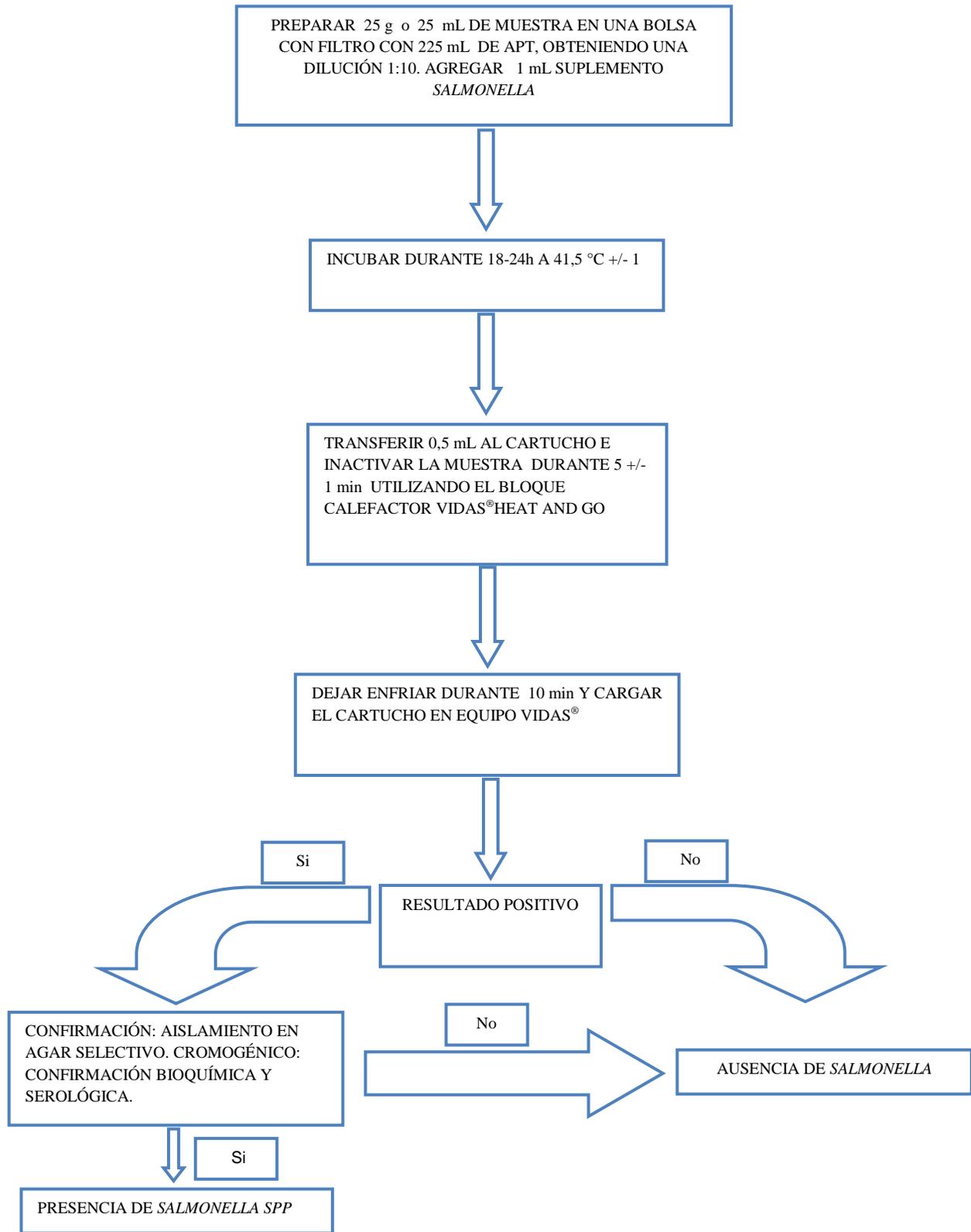


Anexo 2. Fases del método tradicional de cultivo para detección de *Salmonella spp.* según norma ISO 6579:2002.



Fuente: norma ISO 6579: 2002 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.*”

Anexo 3. Protocolo general del método VIDAS[®] UP *SALMONELLA* (Biomérieux)



Fuente: Biomérieux S.A.

Anexo 4. Valores obtenidos en la validación AFNOR del método VIDAS UP *SALMONELLA* de acuerdo a la norma ISO 16140.

Criterio	Valor
Sensibilidad relativa (SE)	97,3 %
Especificidad relativa (SP)	97 %
Exactitud relativa (AC)	97,1%

Fuente: NF Validation certification of VIDAS[®] UP *Salmonella* method.