



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA
DETECCIÓN DE *Salmonella* spp. EN MATRICES DE ALIMENTOS**

Víctor Hugo Riquelme Retamal

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva

PROFESOR GUÍA: MARICEL VIDAL OYARCE

SECRETARÍA REGIONAL MINISTERIAL DE SALUD, REGIÓN METROPOLITANA

SANTIAGO, CHILE
2015



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA
DETECCIÓN DE *Salmonella* spp. EN MATRICES DE ALIMENTOS**

Víctor Hugo Riquelme Retamal

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Nota Final:,

Prof. Guía:	Maricel Vidal Oyarce	Firma:
Profesor Corrector:	Lisette Lapierre Acevedo	Firma:
Profesor Corrector:	Javiera Cornejo Kelly	Firma:

SANTIAGO, CHILE
2015

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de toda la carrera conocí mucha gente importante en mi vida, ya sea de forma pasajera o que dura hasta el día de hoy. A todos ellos, por su gran apoyo en alguna etapa de mi vida, les debo dar las gracias.

En primer lugar, me gustaría agradecerle a la Dra. Maricel Vidal Oyarce, jefa del Laboratorio de Microbiología de la SEREMI de Salud, por haberme permitido realizar esta memoria de título dentro de ese mismo lugar y por aceptar ser mi profesora guía con toda la responsabilidad que eso conlleva. También agradezco a todo el personal de Microbiología; Nicole Álvarez, Cristina Muñoz, Doris Castro, Guillermina Riveros, Karina Rojas, Gabriela Rojas y a Maricel Vidal, por la forma en que me recibieron en el laboratorio, por toda su ayuda, apoyo, paciencia y enseñanza durante la realización de mi práctica profesional y a lo largo de todo el proceso de tesis. De verdad, muchas gracias.

Por otro lado, quisiera agradecer a la Dra. Lisette Lapierre, por ser mi “cotutora” y por toda su ayuda y consejos a lo largo del desarrollo de esta memoria de título. Y también, a la Dra. Javiera Cornejo, por su buena disposición y ayuda.

A todos mis amigos; del colegio, universidad y misceláneos, gracias por su apoyo incondicional, sobre todo en los momentos difíciles por los que tuve que pasar, y por cada experiencia que compartimos juntos durante estos años.

Y lo más importante, agradezco profundamente a mi familia. A mis papás (Hugo Riquelme y Margarita Retamal), por el enorme esfuerzo que han hecho por mí desde el día que nací hasta ahora, por apoyarme en cada decisión que he tomado y por el cariño que me han brindado en todos estos años. A mi hermana, Katherine Riquelme, por el apoyo, ayuda, ánimo, fuerza y cariño entregado. También a mi hermana, María Riquelme, que pese a que ya no está en este mundo, siempre estuvo apoyándome y ayudándome con cualquier cosa que quisiera o necesitara. Le agradezco por las horas que pasaba enseñándome cuando era niño y por todo el cariño que me entregó durante el tiempo que estuvo con nosotros. Sé lo contenta y orgullosa que estaría en este momento, pero donde sea que esté, está apoyándome a mí y a mi familia para salir adelante. Por todo eso y mucho más, este logro está dedicado a ella.

RESUMEN

Salmonella spp. es una bacteria Gram-negativa y agente etiológico de la salmonelosis, enfermedad transmitida por los alimentos (ETA). Es el principal agente bacteriano causante de enfermedad gastrointestinal en nuestro país.

El objetivo de este estudio fue verificar el método analítico VIDAS[®] *Easy Salmonella*, para la detección de *Salmonella* spp. en diferentes matrices de alimentos, dentro del Laboratorio de Salud Pública Ambiental y Laboral de la SEREMI de Salud Región Metropolitana.

Se analizaron 60 muestras correspondientes a cinco matrices de alimentos. Para cada matriz se analizaron 12 muestras, diez de las cuales fueron contaminadas artificialmente con una cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC[®] 14028 y dos fueron analizadas sin contaminar (control). Siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, las muestras fueron pre-enriquecidas, enriquecidas y sometidas a detección inmunoenzimática presuntiva mediante el kit VIDAS[®] *Easy Salmonella*. Las muestras positivas y negativas, fueron sembradas en agar selectivo XLD y confirmadas a través del kit API 20E[®].

El criterio de aceptación de la verificación del método alternativo en cada matriz, fue la detección positiva del 100 % de las muestras contaminadas artificialmente. Para determinar la concordancia existente entre el método alternativo y la siembra en agar XLD, se utilizó el coeficiente estadístico Kappa (κ).

Los datos obtenidos en todas las muestras (hortalizas (10/10), cecinas (10/10), mariscos (10/10), carne de ave (10/10) y mayonesas envasadas (10/10)), arrojaron un 100% de concordancia ($\kappa = 1$) entre el método alternativo y la siembra en agar XLD.

Los resultados sugieren que el método alternativo VIDAS[®] *Easy Salmonella*, puede ser utilizado como método de *screening* en las matrices analizadas, dentro del Laboratorio de Salud Pública Ambiental y Laboral de la Secretaría Regional Ministerial de Salud Región Metropolitana.

Palabras claves: *Salmonella* spp., verificación, VIDAS[®] *Easy Salmonella*.

ABSTRACT

Salmonella spp. is a Gram-Negative bacteria and an etiologic agent of salmonellosis, a foodborne diseases (FBD). It is the main bacterial agent causing gastrointestinal disease in our country.

The objective of this study was to verify the analytical method VIDAS[®] *Easy Salmonella*, for detection of *Salmonella* spp. in different food matrices, inside of the Public Health Laboratory Environmental and Labor of the Health SEREMI of the Metropolitan Region.

Sixty samples from five food matrices were analyzed. For each matrix, 12 samples were analyzed; ten samples were artificially contaminated with a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC[®] 14028 strain and two were remained as uncontaminated samples (control). Following the protocol described by the manufacturer, the samples were pre-enriched, enriched and submitted to presumptive enzyme immunoassay detection by the VIDAS[®] *Easy Salmonella* kit. Positive and negative samples were cultured in selective XLD agar and then confirmed by the API 20E[®] kit.

The acceptance criterion for the verification of the alternative method in each matrix was the positive detection of 100 % of the artificially contaminated samples. To determine the agreement between the alternative method and the culture in XLD agar, the statistical coefficient Kappa (κ) was calculated.

The information obtained in all the samples (vegetables (10/10), smoke-dried meat (10/10), seafood (10/10), poultry meat (10/10) and packaged mayonnaises (10/10)), threw 100 % of agreement ($\kappa = 1$) between the alternative method and the culture in XLD agar.

The results suggest that the alternative method VIDAS[®] *Easy Salmonella* can be used like screening method in the analyzed food matrices, by the Public Health Laboratory Environmental and Labor of the Health SEREMI of the Metropolitan Region.

Key words: *Salmonella* spp., Verification, VIDAS[®] *Easy Salmonella*

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- Antecedentes Generales

Las bacterias del género *Salmonella* pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos Gram-negativo, anaerobios facultativos, no formadores de esporas y, en general, son móviles mediante flagelos peritricos (Martínez, 2011; Estrada y Valencia, 2012). Son bacterias mesófilas, que tienen un rango de crecimiento entre 5 y 46 °C, con un óptimo de 35 °C y 37 °C, y son destruidas mediante el proceso de pasteurización (Estrada y Valencia, 2012). Además, presentan una alta sensibilidad a pH menor o igual a 4,5 y resisten varios días en estados de congelación y deshidratación. Tienen la capacidad de multiplicarse en una gran variedad de alimentos, sin embargo, no pueden multiplicarse en aquellos con actividad de agua (A_w) $\leq 0,94$, en especial con pH igual o menor a 5,5 (Estrada y Valencia, 2012).

La clasificación taxonómica de este género es bastante compleja, sin embargo, actualmente se describen dos especies de *Salmonella*; *S. enterica* y *S. bongori*, siendo la primera dividida en seis subespecies (Méndez *et al.*, 2011; Parra *et al.*, 2002). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* es, epidemiológicamente, la más importante y representa el 99 % de los serotipos aislados (Méndez *et al.*, 2011). *Salmonella* spp. es el agente etiológico de la salmonelosis, enfermedad clasificada como transmitida por los alimentos (ETA).

Las ETA tienen una alta incidencia tanto a nivel nacional, como a nivel mundial. Durante el año 2005, se determinó que 1,8 millones de personas murieron a causa de enfermedades gastrointestinales alrededor del mundo, de éstos, una gran proporción fue atribuida a contaminación de alimentos y agua potable (INS, 2014). En la Unión Europea, las ETA causadas por *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. son las más frecuentes. Sin embargo, la prevalencia de salmonelosis ha disminuido desde el año 2004, debido a los programas de control en la industria aviar (ECDC, 2011, citado por INS, 2014). Por otro lado, en Estados Unidos, se estima que ocurren 76 millones de casos de ETA al año. El *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que, producto de estas enfermedades, existen cerca de 325.000 hospitalizaciones y 5000 muertes (CDC, 2015). Del total de casos estimados, 1,4 millones corresponderían a *Salmonella* spp. (Brenner *et al.*, 2000, citado por ISP,

2012). Sin embargo, durante el periodo 2009-2010 se notificaron 22.444 casos de ETA, de los cuales 1.184 necesitaron hospitalización y 23 de ellos murieron (CDC, 2013).

En cambio, en nuestro país durante el año 2013, se notificaron 1164 brotes de ETA, superando la cifra del año anterior, donde los brotes notificados fueron sólo 1022 (MINSAL, 2014). Por otro lado, hasta julio de 2014, el Instituto de Salud Pública confirmó 1558 cepas de *Salmonella*, provenientes de aislados de origen clínico, cifra que superó en un 13,3 % la cantidad confirmada, a la misma fecha, en 2013 (1350) (ISP, 2014).

En 2011, se notificaron 974 brotes de ETA, en donde se determinó que el principal patógeno asociado era *Salmonella* spp. con un 10,2 % del total de brotes (MINSAL, 2012).

De la totalidad de brotes notificados durante el año 2014, sólo en el 7,6 % se pudo identificar el agente implicado, siendo *Salmonella* spp. el de mayor importancia, aislándose en el 84,8 % de ellos, seguido por *E. coli* diarreogénico, el cual fue aislado en un 3,8 % (MINSAL, 2015).

La salmonelosis es una enfermedad infectocontagiosa cuya signología clínica va desde diarrea, vómitos, cefalea y anorexia, hasta cuadros más severos como meningitis, neumonía o artritis séptica (Martínez, 2011). Puede afectar a cualquier persona, no presenta predisposición por sexo, pero sí por la edad, ya que las personas más afectadas se ubican en los extremos etarios; niños menores de cinco años y ancianos sobre 65 años. En las personas inmunocomprometidas también se observa una mayor incidencia de salmonelosis, la cual se presenta con una marcada estacionalidad, aumentando los casos denunciados en los meses de verano (Martínez, 2011).

Las fuentes más importantes de contagio de salmonelosis, son los alimentos de origen animal, aguas contaminadas y vegetales regados con éstas (Parra *et al.*, 2002). Los alimentos de mayor riesgo son los a base de huevo, lácteos, ensaladas, frutas, pescados, carnes y subproductos animales (Parra *et al.*, 2002).

La principal vía de transmisión de *Salmonella* spp. es la oro-fecal. Esta bacteria se puede encontrar en intestino o vesícula biliar de muchos animales asintomáticos (domésticos y silvestres), eliminándose al medio ambiente por vía fecal de forma permanente o intermitente. Mientras existan condiciones óptimas de temperatura y humedad, puede sobrevivir por periodos prolongados en el ambiente (Anón, 2005).

Debido a que *Salmonella* spp. es la principal causante de ETA en nuestro país, sumado a su amplia distribución en los alimentos para consumo humano, en Chile existen distintos organismos públicos a cargo de la vigilancia de *Salmonella* spp. en alimentos. Estos son:

a) Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), el cual es el encargado de la vigilancia de alimentos para exportación, asegurando que los productos pecuarios que se exportan cumplen con las normas nacionales y con los requerimientos zoonosanitarios de los países importadores (SAG, 2015).

b) Secretaría Regional Ministerial de Salud (SEREMI), quien fiscaliza el cumplimiento de la normativa vigente, para asegurarle a la población que los alimentos que se comercializan son aptos para el consumo humano. Una de las áreas relacionadas con alimentos es el Laboratorio de Microbiología, el cual analiza alrededor de 900 muestras para vigilancia al año, de las cuales 665 requieren análisis de *Salmonella* spp. (73,9 %). Debido a la gran cantidad de muestras analizadas, y la gran necesidad de mantener la inocuidad de los alimentos, se requieren métodos analíticos rápidos, con alta sensibilidad y confiables para detectar la contaminación con *Salmonella* spp. en alimentos de consumo humano.

c) El Instituto de Salud Pública (ISP) es el laboratorio de referencia a nivel nacional, que se encarga de la confirmación de aislamientos clínicos y de alimentos con presencia de *Salmonella* spp. Además, realiza confirmación de la especie y subespecie, y tipificación serológica, en donde se identifican los antígenos flagelares y somáticos para determinar la serovariedad del aislamiento (ISP, 2014).

2. Métodos de detección de patógenos en alimentos

Existen distintos métodos para detectar la presencia de patógenos, utilizados por los laboratorios a cargo de la vigilancia de microorganismos en alimentos.

2.1. Métodos tradicionales

Son métodos de referencia utilizados para la detección de patógenos y son considerados como *Gold Standard* para la validación y verificación de métodos alternativos. Sin embargo, estos métodos generalmente se realizan en etapas que consideran varios días, no tienen la posibilidad de seleccionar muestras positivas presuntivas, requieren de la preparación de un alto número de materiales asociados a cada etapa del análisis, y deben ser realizados por personal altamente calificado (Cádiz, 2014).

2.1.1. Método tradicional de detección de *Salmonella* spp.

El método tradicional para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos utilizado en el Laboratorio de Microbiología de la SEREMI de salud RM, está basado en lo descrito en el capítulo 5 del *Bacteriological Analytical Manual* de la *Food and Drug Administration* (FDA). Este método tiene una duración de seis días y consta de cuatro fases: i) preenriquecimiento no selectivo, ii) enriquecimiento selectivo, iii) siembra e identificación y iv) confirmación de identidad (Andrews *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos son de tipo cualitativo, es decir, presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en 25 g. de alimento.

2.2. Métodos alternativos

Se caracterizan por ser rápidos y fáciles de usar. Mediante estos métodos, se pueden analizar un gran número de muestras por unidad de tiempo, además, poseen una especificidad y sensibilidad similar al método tradicional, pueden ser automatizados y, en general, más rentables para el operador (Jasson *et al.*, 2010, citado por Cadiz, 2014). Sin embargo, estos métodos deben ser validados por organismos especializados, bajo normas internacionalmente reconocidas como la norma ISO 16140, teniendo como referencia al método tradicional. Uno de estos métodos alternativos es el método VIDAS[®] *Easy Salmonella* (Biomérieux).

2.2.1. Método “VIDAS[®] *Easy Salmonella*”

Este método es un ensayo inmunoenzimático que detecta antígenos de *Salmonella* spp. por medio de la técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) (Biomérieux, 2013). Consta de un kit que está compuesto por cartuchos sellados en donde se deposita la muestra que se

analiza y que poseen reactivos listos para su utilización, y por conos (SPR[®]) con anticuerpos contra *Salmonella* spp. adsorbidos en su superficie interna (Biomérieux, 2013). La muestra debe ser preenriquecida en agua peptonada tamponada (APT) y enriquecida selectivamente en caldo SX2. Posteriormente, se transfieren 0,5 ml del caldo, al pocillo abierto del cartucho VIDAS[®]. El equipo dosifica este contenido en el resto de los recipientes del cartucho, los cuales poseen reactivos listos para su utilización. A través de una sucesión de aspirado y expulsado, los antígenos toman contacto con los anticuerpos adsorbidos en la pared del cono. Los antígenos no unidos a anticuerpos, se eliminan mediante lavados sucesivos. Luego, anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina, se unirán a los antígenos de *Salmonella* spp. que a su vez estén unidos al anticuerpo adsorbido al cono. El conjugado no unido a antígeno, se elimina por nuevos lavados. Al final del proceso, el sustrato 4-metil-umbeliferil fosfato, es aspirado y expulsado del cono. La enzima del conjugado cataliza la hidrólisis de ese sustrato, obteniéndose un producto fluorescente. El equipo analiza la fluorescencia obtenida, le asigna un valor y lo compara con referencias internas para finalmente arrojar un resultado cualitativo de la muestra (positivo o negativo a *Salmonella* spp.). Todas las etapas del ensayo son realizadas automáticamente por el equipo VIDAS[®] (Biomérieux, 2013). Posee valores de especificidad relativa de 99,0 %, sensibilidad relativa de 99,1 % y exactitud relativa de 99,0 % (AFNOR, 2005).

3. Validación y verificación de los métodos de detección de patógenos

Para que los métodos alternativos puedan ser utilizados, deben ser previamente validados, por organismos especializados, y verificados dentro del laboratorio en el cual serán utilizados.

3.1. Validación de un método alternativo

Una validación se basa en la comprobación que se realiza para determinar si un método alternativo tiene resultados similares a los obtenidos por un método de referencia. Es un procedimiento extenso que consta de dos partes: una primera etapa de validación por parte de un laboratorio experto, en donde se caracteriza el método, y una segunda etapa que incorpora la realización de un ejercicio colaborativo, en la cual participan distintos

laboratorios a nivel mundial. Para la validación de un método, se utiliza un procedimiento establecido y reconocido internacionalmente, por ejemplo, la norma ISO 16140 (Fornés, 2014).

3.2. Verificación de un método alternativo

Con una verificación se busca comprobar que un laboratorio es capaz de cumplir con las exigencias de ejecución del método en condiciones habituales de trabajo, es decir, sometido a variantes tales como los analistas, matrices, insumos, equipos, entre otras (Fornés, 2014). La verificación se realiza en métodos que ya cuentan con una validación previa, por parte de una de las organizaciones internacionales especializadas en esta materia, como lo son la *Association Française de Normalisation (AFNOR)*, *European Validation and Certification Organisation (MicroVal)* o la *Association of Official Analytical Chemist - Official Methods of Analysis (AOAC-OMA)* (Fornés, 2014). El método alternativo, VIDAS[®] *Easy Salmonella*, cuenta con un certificado de validación emitido por la AFNOR, de acuerdo a lo establecido en la norma ISO 16140:2003, con vigencia hasta septiembre de 2017. Este es el método utilizado actualmente para el análisis de la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en alimentos dentro el Laboratorio de Microbiología de la SEREMI de Salud de la Región Metropolitana.

Considerando todos los antecedentes expuestos, junto con el trabajo de vigilancia que realiza la SEREMI de salud, el cual debe ser representativo de la región, oportuno y eficiente en la entrega de resultados, se debe contar con un método rápido, fácil y confiable para la detección de *Salmonella* spp. en los alimentos de consumo humano de la Región Metropolitana. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue verificar en el Laboratorio de Salud Pública Ambiental y Laboral de la SEREMI de Salud Región Metropolitana, el método analítico VIDAS[®] *Easy Salmonella*, para la detección de *Salmonella* spp., en diferentes matrices de alimentos, como carnes de ave, cecinas, mariscos, hortalizas y mayonesas envasadas, y estimar la concordancia de los resultados con la técnica de siembra en agar selectivo XLD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Salud Pública Ambiental y Laboral de la Secretaría Regional Ministerial (SEREMI) de Salud de la Región Metropolitana, sección “Microbiología”. Para realizar la verificación se tomó como referencia la norma ISO 16140-3 (en evaluación) y la guía de Fornés (2014).

1. Matrices en estudio

Se analizaron 60 muestras de cinco matrices de alimentos, las cuales son analizadas rutinariamente en el Laboratorio de Salud Pública Ambiental y Laboral de la SEREMI de Salud, Región Metropolitana. Las cinco matrices analizadas se encuentran dentro del alcance de la validación del método VIDAS[®] *Easy Salmonella*. Las muestras fueron tomadas por la unidad “Toma de Muestras” del mismo laboratorio, de acuerdo a los protocolos estandarizados que tiene esta institución. Dichas muestras provinieron de distintos lugares de expendio y fábricas de alimentos de la ciudad de Santiago.

Las matrices en estudio fueron: carnes de aves, cecinas, mariscos, hortalizas y mayonesas envasadas. Para cada una de estas matrices se tomaron 12 muestras, diez de las cuales se contaminaron experimentalmente con el patógeno y dos se analizaron sin previa contaminación (controles negativos).

2. Contaminación de las muestras

Las muestras de alimentos fueron contaminadas artificialmente con la cepa *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC[®] 14028TM. La contaminación artificial se realizó con un inóculo mínimo de diez veces el valor del límite de detección relativa (LOD₅₀) establecido en el certificado de validación del método VIDAS[®] *Easy Salmonella*. El LOD₅₀ para este método corresponde a 0,2 y 1,0 UFC/25 g, por lo tanto se inoculó con 2 a 10 UFC/25 g de cada matriz. La concentración máxima aceptada fue 30 UFC en 25 g de alimento.

3. Preparación del inóculo para la contaminación experimental

El inóculo fue preparado a partir de una cepa de trabajo en fase estacionaria (previamente establecida), que fue cultivada en caldo BHI/TSB por 18 ± 1 h a 35 °C. Se realizaron diluciones en base 10 del microorganismo control ya enriquecido y se tomó el volumen de la dilución correspondiente, que contenía la cantidad de bacterias establecido teóricamente, para la contaminación experimental de las muestras.

Para comprobar la cantidad de bacterias inoculadas en el alimento, se sembraron $10 \mu\text{l}$ de las diluciones 10^{-5} a la 10^{-8} por triplicado, en una placa de agar tripticasa de soya (TSA) mediante la técnica de la microgota (Da Silva, 1996). Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 35 °C y se realizó el recuento de las colonias presentes en cada una de ellas.

4. Detección de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium a través del Método VIDAS® Easy Salmonella (Biomérieux®)

Tanto las muestras contaminadas artificialmente y los controles fueron analizadas siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez pesados los 25 g de cada muestra, se agregaron 225 mL de agua peptonada tamponada (APT). En el caso de las muestras de mayonesas, por su alto contenido en grasas, se adicionó el suplemento Tween 80, de acuerdo a la norma ISO 6887-1 (2003). Posteriormente, se homogenizaron en Stomacher® y se incubaron durante 24-26 horas a 37 ± 1 °C. Pasado este tiempo, se transfirió 0,1 mL de la bolsa a un tubo que contenía 10 mL de caldo SX2-T. Se incubaron por 24-26 horas a $41,5 \pm 1$ °C. Luego, se agitó el tubo y se transfirieron 0,5 mL a un pocillo abierto del cartucho de VIDAS® Easy Salmonella. Este cartucho se dispuso en el equipo VIDAS® Heat and Go (Biomérieux) en donde se calentó durante 15 ± 1 min a 100 °C. Inmediatamente, se enfrió por 10 min y se dispuso en el equipo VIDAS®, el cual demora 45 min en realizar la prueba y, finalmente, arroja un resultado cualitativo, es decir, positivo o negativo a *Salmonella* spp. Posteriormente, todas las muestras, tanto las que resultaron positivas como las que resultaron negativas, se sembraron en agar XLD y se incubaron a 35 °C por 24-48 horas. Las colonias sospechosas se traspasaron a agar TSA y se incubaron a 35 °C por 24 ± 2 horas, para su posterior confirmación mediante el kit API 20E®.

5. Análisis de los resultados

El criterio de aceptación de la verificación del método alternativo en cada matriz (carne de ave, cecinas, mariscos, hortalizas y mayonesa), fue la detección positiva del 100 % de las muestras contaminadas artificialmente. En el caso que se detectara un porcentaje menor, se buscaron las posibles causas de este resultado. Si al analizar las causas se detectaba un error, se debía repetir la verificación. Se debe tener en cuenta que las muestras no contaminadas podían resultar negativas o positivas por contaminación natural.

Se utilizó el coeficiente estadístico Kappa (κ), para determinar la concordancia existente entre el método VIDAS[®] *Easy Salmonella* y la siembra en agar selectivo (XLD) para cada matriz estudiada. Este coeficiente entrega el grado de acuerdo existente entre dos observadores (en este caso metodologías), corrigiendo el porcentaje de concordancia que se pueda presentar por azar. Su distribución va de -1 a +1, siendo este último la concordancia perfecta. Por el contrario, valores negativos indican discordancia en los observadores. Un valor igual a cero ($\kappa = 0$) indica que la concordancia obtenida es igual a la debida, exclusivamente, al azar (López y Pita, 1999, citado por Cerda y Villarroel, 2008). Para su medición, los datos obtenidos se agruparon como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Tabulación de resultados para el cálculo del coeficiente Kappa.

	Método 1			
Método 2		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	a	b	f1
	Negativo	c	d	f2
	Total	c1	c2	

a: resultados positivos por ambos métodos; b: resultados negativo por el método 1 y positivo por el método 2; c: resultados positivos por el método 1 y negativo por el método dos; d: resultados negativos por ambos métodos; f1: sumatoria de a + b; f2: sumatoria de c + d; c1: sumatoria de a + c; c2: sumatoria de b + d.

6. Bioseguridad

Las directrices de bioseguridad utilizadas para la realización de este estudio, fueron las adoptadas por el laboratorio de Microbiología de la SEREMI de Salud de la Región Metropolitana. Este laboratorio cuenta con la infraestructura necesaria para el trabajo con patógenos bacterianos, de acuerdo a las normas de seguridad exigidas por el Manual de Normas de Bioseguridad editado por CONICYT (versión 2008). Las bacterias del género *Salmonella* se ubican en el nivel de bioseguridad 2. De acuerdo con esto, se cuenta con seis áreas independientes de trabajo: recepción, preparación y siembra de muestras, sala de estufas, sala de trasposos y lectura, sala de biología molecular, sala de lavado, preparación y esterilización de material. Específicamente, el área de preparación y siembra de muestras, corresponde a una sección de contención que posee accesos de seguridad y medidas para el control de acceso. Tanto en la sala de preparación de muestras como en la de biología molecular, se cuenta con campanas de flujo laminar y gabinetes de bioseguridad con filtros EPA y características técnicas que garantizan la bioseguridad del personal que las usa. Todo el material residual se autoclava en recipientes especialmente destinados para tal efecto y el proceso se lleva a cabo en un equipo y en un sector de la sala de esterilización, específicamente destinado a la descontaminación de material.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos por ambos métodos en cada matriz alimentaria, se agrupan en las tablas 2, 3, 4, 5 y 6.

- 1. Mariscos:** las 12 muestras analizadas corresponden a almejas frescas provenientes del Terminal Pesquero de Santiago. Para la contaminación de las muestras, se utilizó un inóculo cuya concentración iba desde 1,4 UFC a 15 UFC y se agregó a 25 g de la muestra. Los datos obtenidos se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Valores obtenidos en muestras de mariscos (almejas).

		Método VIDAS		
		Positivo	Negativo	Total
XLD	Positivo	10	0	10
	Negativo	0	2	2
	Total	10	2	12

- 2. Hortalizas:** se analizaron cinco tipos de hortalizas (lechuga, cilantro, betarraga, acelga, perejil), dos muestras de cada tipo, a excepción de lechuga, que en ese caso se utilizaron cuatro muestras. Las verduras fueron muestreadas en predios agrícolas de la Región Metropolitana y elegidas al azar, dependiendo de la programación del laboratorio. En este caso, la contaminación se realizó con una concentración de bacterias entre las 7,5 hasta las 25 UFC en 25 g. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Valores obtenidos en muestras de distintos tipos de hortalizas.

		Método VIDAS		
		Positivo	Negativo	Total
XLD	Positivo	10	0	10
	Negativo	0	2	2
	Total	10	2	12

- 3. Carne de Ave:** se analizaron seis cortes distintos de pollo, con diferente nivel de procesamiento, los cuales incluían desde trutro entero, hasta cubitos de pechuga de pollo, entre otros. El nivel de contaminación de las diez muestras contaminadas

artificialmente fue 12,5 UFC para cuatro muestras y 25 UFC para seis muestras, en 25 g de alimento. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Valores obtenidos en muestras de Carne de ave (pollo).

		Método VIDAS		
		Positivo	Negativo	Total
XLD	Positivo	10	0	10
	Negativo	0	2	2
	Total	10	2	12

4. **Cecinas:** se analizaron seis tipos de cecinas al azar (salchichón, vienas artesanales, queso de cabeza, jamonada, vienas tradicionales y daditos de jamón). Diez de las muestras fueron contaminadas entre 13 y 16 UFC en 25 g. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Valores obtenidos en muestras de distintos tipos de cecinas.

		Método VIDAS		
		Positivo	Negativo	Total
XLD	Positivo	11	0	11
	Negativo	0	1	1
	Total	11	1	12

5. **Mayonesas:** las mayonesas analizadas en este estudio, provinieron de distintos supermercados de la capital. Todas fueron mayonesas envasadas, de distintas marcas y con distinto porcentaje de grasa, el cual varió entre el 16 al 71 %. Diez muestras fueron contaminadas utilizando un inóculo que contaba con entre 12,5 y 25 UFC para 25 g de muestra. Los resultados obtenidos se agrupan en la tabla 6.

Tabla 6. Valores obtenidos en muestras de mayonesas envasadas de distintas marcas.

		Método VIDAS		
		Positivo	Negativo	Total
XLD	Positivo	10	0	10
	Negativo	0	2	2
	Total	10	2	12

Con los datos obtenidos se calculó el índice Kappa de las cinco matrices anteriores, el cual fue determinado en 1 en cada matriz analizada, es decir, existió una concordancia clasificada como “muy buena”, ya que los resultados son 100 % concordantes (concordancia perfecta). Este valor fue superior a lo esperado por azar, el cual se estimaba en 72,2 %. El error estándar, en estos casos, es igual a cero ($SE = 0$).

Los resultados obtenidos en todas las matrices (60 muestras) se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Valores obtenidos en las 60 muestras analizadas.

		Método VIDAS		
		Positivo	Negativo	Total
XLD	Positivo	51	0	51
	Negativo	0	9	9
	Total	51	9	60

DISCUSIÓN

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

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

En nuestro país, durante el año 2014, se notificaron 1036 brotes de ETA y sólo se pudo identificar el agente causal en el 7,6 % de ellos, siendo *Salmonella* spp. el principal patógeno aislado, encontrándose en el 84,7 % de los casos identificados (MINSAL, 2015). Esta cifra de brotes asociados a un agente etiológico, está muy alejada de la realidad de otros países más desarrollados, como por ejemplo, Estados Unidos, en donde durante el periodo 2009 – 2010, del total de brotes (1.527), se pudo identificar el agente en 1.022 de ellos (67 %), aislando *Salmonella* spp. en el 30 % (CDC, 2013). Esto podría explicarse por una mayor cantidad de recursos destinados a estas enfermedades, lo que conlleva una mejor investigación epidemiológica, por lo tanto, permite llegar a la causa, o patógeno implicado, en un mayor número de brotes.

Si bien en nuestro país no se cuenta con los datos certeros del patógeno implicado en cada uno de los brotes notificados de ETA, existe un programa de vigilancia activa, realizado por la SEREMI de Salud, que tiene como objetivo asegurar alimentos inocuos a la población nacional, para así prevenir la aparición y el aumento de casos de estas enfermedades.

A pesar que los métodos tradicionales de detección de microorganismos en alimentos son efectivos, tienen la desventaja de utilizar muchos recursos, tiempo (al presentar un mayor número de etapas asociadas) y mano de obra especializada (Anexo 2). Por este motivo, se han desarrollado metodologías alternativas. Los métodos alternativos tienen la

característica de ser más rápidos, fáciles de utilizar y se pueden analizar un gran número de muestras por unidad de tiempo. Los métodos inmunoenzimáticos, como los kit VIDAS[®], detectan antígenos de los microorganismos en muestras de alimentos que han sido previamente enriquecidas (Biomérieux, 2013). Estos métodos constan de menos etapas y son más sensibles y específicos que los métodos tradicionales (Anexo 3). Esto es lo que requiere la SEREMI de Salud, ya que se necesita contar con métodos rápidos, certeros y confiables, para la detección de microorganismos en los alimentos, para asegurar a la población que los alimentos que se comercializan son aptos para su consumo cuando son ingeridos de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Antiguamente, pese a que no existía un protocolo estandarizado de verificación, se seguía los mismos pasos que para una validación, es decir, se realizaba el análisis de un cierto número de muestras, mediante el método tradicional y el método a validar en paralelo. Del total de muestras, el 50 % era contaminado y el otro 50 % se analizaba sin contaminar. Además, para la verificación de métodos alternativos cualitativos, se debían calcular algunos indicadores, tales como la concordancia positiva (PA), concordancia negativa (NA), desviación positiva (PD) y desviación negativa (ND). Todos estos datos obtenidos eran utilizados para poder determinar los criterios comparativos entre los métodos (sensibilidad relativa (SE), especificidad relativa (SP) y exactitud relativa (AC)), tal como se indica en la verificación del método VIDAS[®] UP *Salmonella*, realizado por Cádiz dentro del Laboratorio de Bacteriología del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) en el año 2014 (Cádiz, 2014). Sin embargo, debido a que estos mismos parámetros son establecidos en una validación oficial, en la versión actualizada de la norma ISO 16140 (año 2014) se establece un protocolo de verificación más sencillo, en el cual se elimina la determinación de los parámetros antes señalados y se disminuye el número de muestras analizadas. En este protocolo se utilizan sólo 12 muestras y diez de ellas son contaminadas artificialmente. El criterio de aceptación es la determinación positiva del 100 % de las muestras contaminadas artificialmente (ISO 16140-3, 2014).

El objetivo de esta Memoria de Título fue verificar el funcionamiento del método analítico alternativo VIDAS Easy *Salmonella*[®], dentro del Laboratorio de Salud Pública Ambiental y Laboral de la SEREMI de Salud de la Región Metropolitana, siguiendo lo descrito por el

protocolo actual de verificación de métodos alternativos, presentado en la norma ISO 16140-3. Las matrices fueron elegidas basándose en lo recomendado en la norma ISO 16140-1 en su anexo B (*Classification of sample types for validation studies*) y según las muestras más frecuentemente analizadas en este laboratorio. Se analizaron un total de 60 muestras (n=60), correspondientes a cinco tipos de matrices (hortalizas, carne de ave, mariscos, cecinas y mayonesas envasadas).

Respecto de las matrices, un punto importante en la metodología VIDAS[®] *Easy Salmonella* es el tratamiento de las muestras. El instructivo emitido por el fabricante menciona que para ciertas matrices se recomienda seguir las especificaciones incluidas en las normas ISO 6887 (desde su apéndice 1 al 5) e ISO 6579 (Biomerieux, 2013). Por este motivo, en el caso de las mayonesas, se agregó el suplemento Tween 80[®], el cual tiene acción detergente, es decir, emulsiona y disuelve grasas. Mediante la adición de este suplemento, se buscó deshacer la capa de grasa que pudiera estar rodeando a las bacterias y que podría impedir la exposición de los antígenos bacterianos. Por otro lado, dos muestras de perejil que fueron contaminadas artificialmente, resultaron negativas por las dos metodologías, sin embargo, se identificó la causa (mala homogenización) y se repitió el análisis en una nueva muestra del mismo tipo de hortaliza. En este caso, sólo fue necesario aumentar el tiempo de homogenización en Stomacher[®], pasando de 30 seg a 1 min.

Los controles negativos utilizados en este estudio, pudieron resultar negativos o positivos por contaminación natural. Cabe destacar que de las 665 muestras analizadas anualmente en el laboratorio de microbiología de la SEREMI de Salud, que requieren análisis de *Salmonella* spp., sólo el 5 % (30) resulta positiva a la bacteria y pese a que en este estudio se analizaron únicamente 60 muestras, una de ellas resultó positiva a *Salmonella* spp. por ambas técnicas, sin haber sido contaminada previamente. La muestra contaminada naturalmente, correspondía a jamonada y fue confirmada mediante el kit API 20E[®], el cual dio como resultado *Salmonella* spp. con un 99,9 % de confianza.

Todas las muestras en las que se obtuvo crecimiento de colonias sospechosas de *Salmonella* spp. en placa de agar selectivo XLD, fueron traspasadas a agar TSA y analizadas mediante el kit confirmatorio API 20E[®], el que dio como resultado *Salmonella* spp. en la mayoría de las muestras (42), con un 99,9 % de confianza. En cinco muestras (una de mayonesa y

cuatro de pollo), arrojó *Salmonella* spp. con un 89,9 % de confianza, mientras que en dos muestras de mariscos lo hizo con 65,5 %. Además, en dos muestras de carne de ave, el kit identificó *Salmonella choleraesuis* con un 99,6 % de confianza. Las muestras de alimentos crudos, como es el caso de las hortalizas, mariscos y carne de ave, en general, tienen una mayor contaminación biológica que los alimentos con algún nivel de cocción, ya que las altas temperaturas disminuyen la cantidad de bacterias presentes en los alimentos. Sin embargo, esto no es exclusivo de los alimentos crudos, ya que puede existir contaminación posterior al tratamiento térmico. Los resultados no esperados (9) obtenidos por el kit confirmatorio API 20E[®], podrían deberse a que las muestras utilizadas estaban naturalmente contaminadas con una cepa de *Salmonella* distinta a la utilizada en este estudio, y debido a que en una placa de agar XLD todas las colonias de este género tienen las mismas características, se pudo haber elegido una de esas colonias para ser sembrada en agar TSA, la cual fue detectada por el kit en mayor porcentaje que la cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium con la que se contaminaron artificialmente las muestras.

Los resultados en las distintas matrices, arrojaron una concordancia perfecta ($Kappa = 1$), es decir, el método alternativo y la siembra en agar selectivo (XLD) coincidieron en el 100 % de sus resultados. Este valor fue superior a lo esperado por azar, el cual se estimaba en 72,2 %. El error estándar, en estos casos, es igual a cero ($SE = 0$).

Considerando que fue posible identificar todas las muestras contaminadas artificialmente mediante el método a verificar, se puede concluir que el método alternativo VIDAS[®] Easy *Salmonella*, puede ser utilizado como método de *screening* en muestras de carne de pollo, mariscos, cecinas, hortalizas y mayonesas envasadas, dentro del Laboratorio de Salud Pública Ambiental y Laboral de la SEREMI de Salud Región Metropolitana.

BIBLIOGRAFÍA

AFNOR. ASSOCIATION FRANÇAIS DE NORMALISATION. 2005. Validation Certificate for Alternative Analytical Method According to Standard EN ISO 16140:2003: VIDAS[®] *Easy Salmonella* (BIO12/16-09/05). La Plaine Saint-Denis, Francia. 3-4 p.

ANDREWS, W.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. 2014. *Salmonella*. **In:** Bacteriological Analytical Manual. Versión Febrero 2014. Food and Drug Administration (FDA). Washington, D.C., EEUU. [en línea]. <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>> [consulta : 11-05- 2014]

ANÓN. 2005. Animal Disease Factsheets: Salmonellosis (Paratyphoid, Non-typhoidal Salmonellosis). Center for Food Security & Public Health, Universidad Estatal de Iowa. Ames, Iowa, Estados Unidos. [en línea]. <http://www.ivis.org/advances/Disease_Factsheets/nontyphoidal_salmonellosis.pdf> [consulta : 15-03- 2014]

BIOMÉRIEUX. 2013. Manual de kit “VIDAS[®] *Salmonella*”, versión en español. Marcy l'Etoile, Francia. 1 p.

BRENNER, F.; VILLAR, R.; TAUXE, R.; SWARMINATHAN, B. 2000. *Salmonella* nomenclature. Journal of Clinical Microbiology. Vol 38 n°7. 2465-2467 p. (Citado por INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA (ISP). 2012. Boletín laboratorio y vigilancia al día (n°15). Departamento de asuntos científicos. Instituto de Salud Pública (ISP), Ministerio de Salud, Chile. [en línea]. <<http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2012/06/BOLETIN%2015.pdf>> [consulta : 26-04-2015])

CÁDIZ, L. 2014. Verificación de un método basado en bacteriófagos para detección de *Salmonella* spp. en muestras del ámbito alimentario. Memoria de título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. 6-9 p.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2013. Morbidity and Mortality Weekly Report: Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks – United States, 2009-2010. 62 (3): 41-47. [en línea] <<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm6203.pdf>> [consulta: 26-04-2015].

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2015. Infecciones transmitidas por los alimentos: información general. [en línea] <http://www.cdc.gov/nczved/es/enfermedades/infecciones_alimentos/#que> [consulta : 26-05-2015]

CHILE. MINISTERIO DE SALUD, 2014. Brotes enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) Chile, semana epidemiológica (SE) 1 a 52 año 2013. Ministerio de salud, departamento de epidemiología, Chile. [en línea]. <http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Entericas/ETA_2013.pdf> [consulta : 11-12-2014]

CHILE. MINISTERIO DE SALUD, 2015. Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) situación epidemiológica año 2014. Ministerio de Salud, departamento de Epidemiología, Chile. [en línea] <http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Entericas/Informe_entericas_2014.pdf> [consulta : 20-05-2015]

COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA (CONICYT) 2008. Manual de Normas de bioseguridad, Segunda Edición. Santiago, Chile.

D'AOUST, J-Y. 1997. Especies de *Salmonella*, p. 133-163. En Doyle, M. P., L. R. Beuchart, and T. J. Montville (ed.) *Microbiología de los Alimentos*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza. (Citado por MARTÍNEZ, I. 2011. Desarrollo de métodos de detección de *Salmonella* basados en la reacción en cadena de la polimerasa y su validación en muestras alimentarias. Tesis doctoral. País Vasco, España. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco. 3-7 p.)

DA SILVA R. 1996. Técnica de Microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Universida de Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 1-7 p

ESTRADA, J.; VALENCIA, B. 2012. Determinación de *Salmonella* spp. en huevos frescos de gallina en los principales mercados de la ciudad de Quito. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. Quito, Ecuador. Universidad Central del Ecuador. 4 p.

EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). 2011. Informe epidemiológico anual 2011. Estocolmo, Suecia. (Citado por INS. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS). 2014. Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). Instituto Nacional de Salud (INS), Ministerio de Salud y Protección Social, Colombia. [en línea]. <<http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Enfermedades%20Trans.%20por%20alimentos.pdf>> [consulta : 26-04-2015])

FORNÉS, D. 2014. Metodología para validación interna de métodos de ensayo microbiológicos alternativos en alimentos. In: Validación de métodos microbiológicos. Santiago, Chile. 26-27 marzo 2014. Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria (ACHIPIA), Ministerio de Agricultura. pp. 3, 17-19

INS. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. 2014. Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). Instituto Nacional de Salud (INS), Ministerio de Salud y Protección Social, Colombia. [en línea]. <<http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Enfermedades%20Trans.%20por%20alimentos.pdf>> [consulta : 26-04-2015]

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION - ISO 6887-1. 2013. Microbiology of the food chain -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. Suiza. 8p

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION - ISO 16140. 2003. Microbiology of the food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods. Suiza. 35-36p

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION - ISO 16140. 2014. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 3: Protocol for the verification of reference and alternative methods implemented in a single laboratory. Suiza. 1-3p

ISP. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA. 2014. Vigilancia de laboratorio *Salmonella* spp. 2009-2014. Instituto de Salud Pública (ISP), Ministerio de Salud, Chile. [en línea]. <[http://www.ispch.cl/sites/default/files/Boletin%20Salmonella%202009-2014%20\(23-10-2014\)%20.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/Boletin%20Salmonella%202009-2014%20(23-10-2014)%20.pdf)> [consulta : 03-03-2015]

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; AND M. UYTENDAELE. 2010. Alternative microbial methods: an overview and selection criteria. Food Microbiology 27: 710-730 p. (citado por CÁDIZ, L. 2014. Verificación de un método basado en bacteriófagos para detección de *Salmonella* spp. en muestras del ámbito alimentario. Memoria de título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. 6-7 p.)

LOPEZ, I.; PITA, S. 1999. Medidas de concordancia: el coeficiente kappa. Cad aten primaria. 6: 169- 71 p. (Citado por CERDA, J.; VILLARROEL, L. 2008. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. Rev Chil Pediatr. 56 p. [en línea]. <<http://www.scielo.cl/pdf/rcp/v79n1/art08.pdf>> [consulta : 11-08-2014])

MARTÍNEZ, I. 2011. Desarrollo de métodos de detección de *Salmonella* basados en la reacción en cadena de la polimerasa y su validación en muestras alimentarias. Tesis doctoral. País Vasco, España. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco. 3-7 p.

MÉNDEZ, I.; BADILLO, C.; PARRA, G.; FACCINI, A. 2011. Caracterización microbiológica de *Salmonella* en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá, Colombia. Julio a octubre de 2010. MED. UIS. 2011;26(1):25-32.

PARRA, M.; DURANGO, J.; MÁTTAR, S. 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. MVZ-CÓRDOBA 2002; 7:(2), 187-200

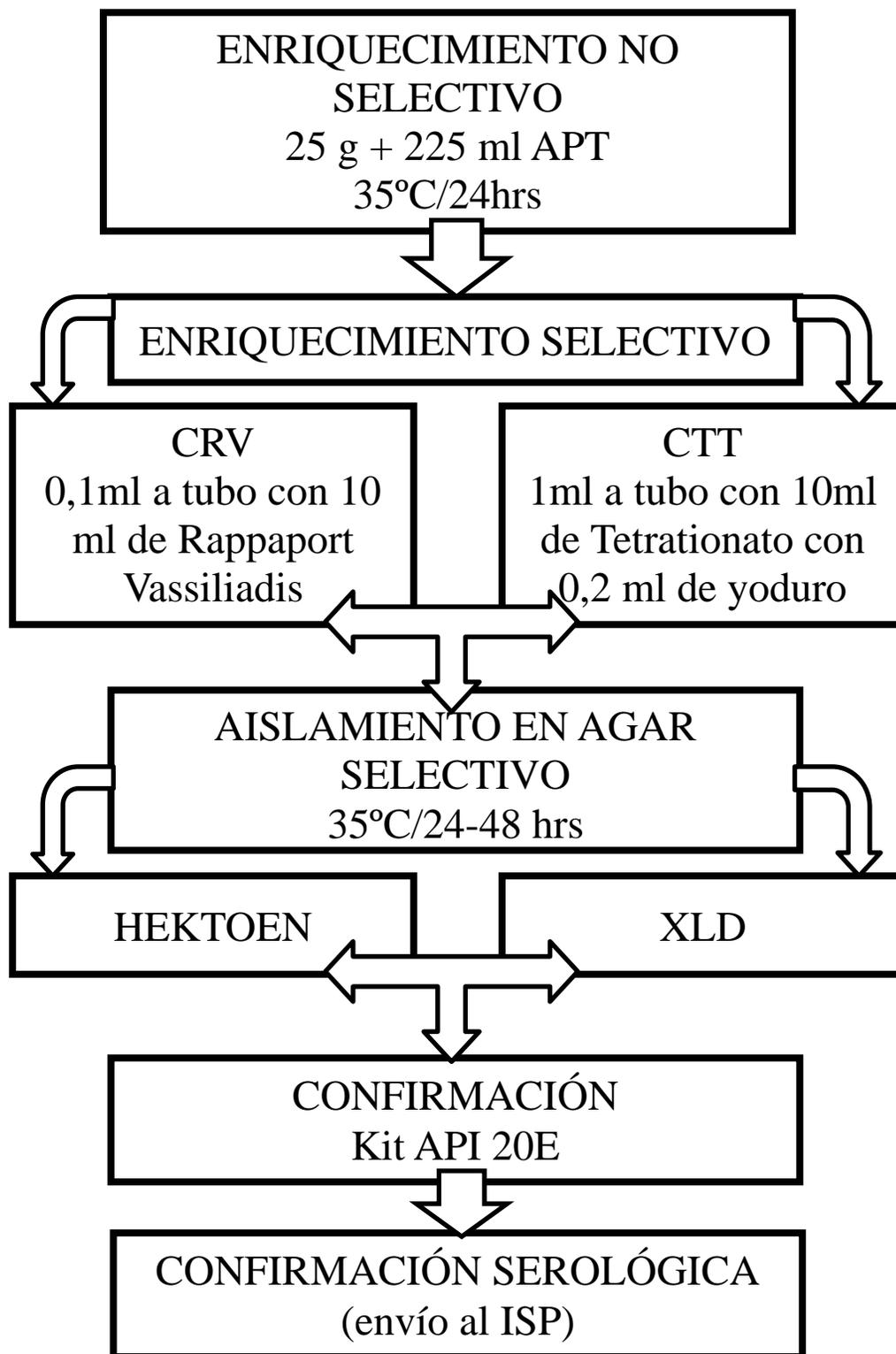
SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG). 2015. Ámbitos de acción: Exportaciones. [en línea]. <<http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/exportaciones-1>> [consulta : 24-02-2015]

ANEXOS

Anexo 1: Comparación de las características del método tradicional y el método VIDAS®
Easy Salmonella.

Método tradicional	VIDAS Easy Salmonella
Efectividad	Efectividad – Eficiencia
Mayor tiempo	Menor tiempo
Más etapas asociadas	Menos etapas
Cierto nivel de complejidad	Fácil de usar
Número limitado de muestras analizadas	Mayor números de muestras analizadas por unidad de tiempo
Mayor tiempo	Menor tiempo
Mano de obra especializada	Mano de obra especializada

Anexo 2. Etapas del método tradicional de cultivo para la detección de *Salmonella* spp. utilizado en el Laboratorio de Salud Pública Ambiental y Laboral de la Secretaría Regional Ministerial (SEREMI) de Salud de la Región Metropolitana, sección “Microbiología”.



Anexo 3. Etapas del método alternativo, VIDAS[®] *Easy Salmonella*, para la detección de *Salmonella* spp.

