



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

**IMPLEMENTACIÓN Y VERIFICACIÓN DE DOS MÉTODOS
CUALITATIVOS PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella* spp. EN
PRODUCTOS HIDROBIOLÓGICOS**

Alonso Esteban Ramírez Vera

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

PROFESOR GUÍA: PILAR OVIEDO HANNIG
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2016



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

**IMPLEMENTACIÓN Y VERIFICACIÓN DE DOS MÉTODOS
CUALITATIVOS PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella* spp. EN
PRODUCTOS HIDROBIOLÓGICOS**

Alonso Esteban Ramírez Vera

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

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESOR GUÍA : DRA. PILAR OVIEDO HANNIG

PROFESOR CONSEJERO : DRA. JAVIERA CORNEJO KELLY

PROFESOR CONSEJERO : DRA. CONSUELO BORIE POLANCO

SANTIAGO, CHILE

AÑO 2016

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 2 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| INTRODUCCIÓN | 4 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 5 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 10 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 10 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 11 |
| 1. Normas de bioseguridad | 11 |
| 2. Cepa Bacteriana | 11 |
| 3. Matrices Alimentarias..... | 11 |
| 4. Implementación de Metodologías..... | 12 |
| 5. Verificación de las metodologías..... | 12 |
| 5.1 Preparación del inóculo..... | 13 |
| 5.2 Determinación de la absorbancia específica para <i>Salmonella Typhimurium</i> | 13 |
| 5.3. Contaminación de las muestras..... | 15 |
| RESULTADOS | 16 |
| Verificación de Normas | 16 |
| 1.1. Verificación norma ISO 6579:2002 en salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)..... | 16 |
| 1.2. Verificación Norma ISO 6579:2002 en chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) | 17 |
| 1.3. Verificación norma NCh 2675.Of2002 en salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>).. | 17 |
| 1.4. Verificación Norma NCh 2675.Of2002 en chorito (<i>Mytilus chilensis</i>)..... | 18 |
| DISCUSIÓN | 19 |
| CONCLUSIONES | 21 |
| BIBLIOGRAFÍA | 22 |
| ANEXOS | 26 |
| Anexo 1. Certificado de Bioseguridad..... | 26 |
| Anexo 2. Método para detección de <i>Salmonella</i> spp. norma ISO 6579:2002. | 27 |
| Anexo 3. Método para detección de <i>Salmonella</i> spp. norma Nch 2675.Of2002..... | 28 |

RESUMEN

Salmonella spp. es una de las mayores causas de enfermedad entérica tanto en el hombre como en animales, estimando la OMS que decenas de millones de casos se producen en el mundo cada año. En Chile, la norma de referencia para la detección de este patógeno en productos hidrobiológicos es la norma chilena NCh 2675.Of2002, esta no tiene validación internacional, como si lo tiene la normativa ISO 6579:2002.

Este estudio tiene por finalidad implementar y verificar ambos métodos de detección de *Salmonella* spp. para las matrices alimentarias chorito (*Mytilus chilensis*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos (LIA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La verificación de las metodologías se llevó a cabo, siguiendo los pasos descritos en la norma ISO 16140-3. Además, se usó la cepa bacteriana *Salmonella* Typhimurium, la cual fue confirmada para género y especie en el Instituto de Salud Pública de Chile.

En la verificación de ambas metodologías, se logró la detección de un 100% de las muestras contaminadas en el laboratorio, cumpliendo todos los criterios de aceptación descritos en la norma ISO 16140-3 para las matrices analizadas.

Los resultados obtenidos demuestran la capacidad del Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile para realizar ambos métodos en las matrices estudiadas, entregando resultados confiables, en la detección de *Salmonella* spp. en productos hidrobiológicos. Todo esto, verificado a través de estándares dictados por la Organización Internacional de Normalización (ISO). El uso de normas ISO, facilitaría el comercio internacional al proporcionar estándares comunes entre países.

Palabra claves: *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhimurium, implementación, verificación

ABSTRACT

Salmonella spp. is one of the major causes of enteric disease as much in man and animals; the WHO estimates that tens of millions of cases occur each year worldwide. In Chile, the reference standard for detection of this pathogen in seafood products is the Chilean norm Nch 2675.Of2002, which does not have international validation, different from the ISO 6579:2002, which does have.

The purpose of this study is to implement and verify both methods of detection of *Salmonella* spp. for food matrices for mussel (*Mytilus chilensis*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*), in the Laboratory of Food Safety (LIA), Faculty of Veterinary and Animal Sciences at the University of Chile. Verification methodologies were carried out following the steps described in ISO 16140-3. In addition, the bacterial strain *Salmonella* Typhimurium, which was confirmed for genus and species at the Institute of Public Health of Chile, was used for the investigation. For the verification of both methods, a detection of a 100% of the samples contaminated in the laboratory was achieved, meeting all acceptance criteria described in ISO 16140-3 standard for matrices analyzed.

The obtain results demonstrate the ability of the Laboratory of Food Safety, of the Faculty of Veterinary and Animal Sciences at the University of Chile for both methods in the matrices studied, delivering reliable results, in detecting *Salmonella* spp . in seafood products . All this, verified through standards issued by the International Organization for Standardization (ISO). The use of ISO standards, facilitate international trade by providing common standards between countries.

Key words: *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhimurium, implementation, verification.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son de gran relevancia en el ámbito de la salud pública mundial, reconociéndose cada vez más la importancia de sus repercusiones sobre la salud de la población, ya sea por la frecuencia con la que ocurren, como por el impacto que pueden causar, afectando a una persona o a grupos de ellas y variando desde un dolor estomacal hasta la muerte. Dentro de éstas, la salmonelosis es una de las principales enfermedades gastroentéricas, es causada por *Salmonella* spp. y se produce principalmente por la ingestión de alimentos de origen animal contaminados, siendo los serotipos Enteritidis y Typhimurium los más frecuentes.

Por otra parte, los productos pesqueros y acuícolas están entre los productos alimenticios más comercializados a nivel mundial, representando el 10% del valor de las exportaciones de los sectores agropecuario, silvícola, pesca y acuicultura. Chile se encuentra dentro de los 10 primeros países exportadores de productos alimenticios hidrobiológicos.

En Chile, el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca), es el organismo encargado de asegurar que los productos hidrobiológicos cumplan los requisitos zoosanitarios para la exportación. Para esto, existe el Programa de Aseguramiento de la Calidad (PAC), el cual mantiene un control periódico microbiológico, químico y físico a través de laboratorios que verifican mediante el análisis de muestras el correcto funcionamiento de la línea de producción. En este contexto, para el análisis de *Salmonella* spp. en productos hidrobiológicos actualmente se utiliza la Norma Chilena NCh 2675.Of2002, la cual está basada en métodos de referencia internacional, sin embargo no tiene la misma validez, a diferencia de las normas ISO, ICMSF, FDA, AOAC y OIE. Además, para la implementación de estas normas en un laboratorio se debe realizar un proceso de verificación, a través del cual, se demuestra su capacidad para llevar a cabo el análisis en las matrices de interés.

La presente memoria de título tiene por objetivo, implementar en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos, dos métodos para la detección de *Salmonella* spp. en productos hidrobiológicos. Uno es el utilizado actualmente en nuestro país, norma NCh 2675.Of2002 y el segundo es el método ISO 6579:2002. Ambos métodos se verificarán siguiendo el protocolo descrito en la norma ISO 16140-3.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae y corresponde a bacilos Gram negativos, que se comportan como patógenos primarios (Retamal *et al.*, 2010). Son bacterias mesófilas, con una multiplicación óptima entre 35 y 37°C, pero pueden desarrollarse entre los 5 y los 46° C. Pueden sobrevivir a la desecación y refrigeración por largo tiempo. Además, se multiplican en varios alimentos sin afectar sus cualidades organolépticas (Ray, 2004). Asimismo, pueden sobrevivir en productos con altas concentraciones de sal, sobre todo en aquellos alimentos con un elevado contenido de proteínas o grasas, como salchichas saladas; también resisten el ahumado. Se ha indicado que pueden sobrevivir un largo periodo de tiempo en el suelo y en el agua (Acha, 2001). Los procedimientos normales de cocción disminuyen al mínimo la probabilidad de ingerir este patógeno, por lo tanto, la mayor preocupación está relacionada al consumo de moluscos y pescados crudos, en preparaciones tales como el ceviche o el sushi (Huss *et al.*, 2000).

En países donde la incidencia de enfermedad por salmonelas tíficas es muy baja, cobran una mayor relevancia serotipos capaces de infectar a las personas y otros animales. Siendo una de las más importantes, *S. enterica* de la serovariedad Enteritidis (Ryan y Ray, 2011).

La expansión epidemiológica de *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) en Chile es consecuencia principalmente del desarrollo que tuvo la industria de los alimentos, específicamente la industria avícola a principio de los años 90', la que cambió desde un perfil atomizado de proveedores artesanales y de pequeñas y medianas empresas hacia una centralización de esta industria, con grandes empresas que acapararon gran parte del mercado nacional. Esta centralización implicó grandes volúmenes de aves compartiendo alimentos, hábitat y microorganismos comunes. Al mismo tiempo, la distribución de estos productos diseminó el patógeno por todo el país. Las infecciones por *S. Enteritidis* aparecieron en forma dramática en 1994 en el norte del país con cifras que implicaban un 3.000% de aumento sobre los esporádicos casos registrados históricamente. Las cifras aumentaron desde un promedio de 0,35 casos por 100.000 observados entre 1990 y 1993, a valores superiores a 3 casos por 100.000 habitantes en 1994 y sobre 5 por

100.000 en 1998 (Fica *et al.*, 2001). Para el año 2010 (1.826 casos), se estimó una tasa de 10,7 casos por 100.000 habitantes, siendo el doble respecto de 1998 (Fica *et al.*, 2012).

La salmonelosis es una infección alimentaria causada por una enterobacteria del género *Salmonella*. Esta es la mayor causa de enfermedad entérica tanto en el hombre como en animales (MINSAL, 2012). Se estima que decenas de millones de casos se producen en el mundo cada año (WHO, 2013). El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), valora que el número de casos de salmonelosis en EEUU es de 1,2 millones al año, con 23.000 hospitalizaciones y 450 muertes (Scallan *et al.*, 2011). El 2012, los casos notificados asociados a *Salmonella* en ese país, fueron de 7.800 (39,9%), siendo el serotipo Enteritidis el más frecuente (18%) (CDC, 2012). Asimismo, en la Unión Europea (UE), en el mismo año se notificaron 5.363 de brotes de ETA, de los cuales 1.533 fueron ocasionados por *Salmonella*, siendo la causa más frecuente de enfermedad gastroalimentaria (29,3%). Del total de brotes producidos por *Salmonella*, 70 fueron vehiculizados por pescado y derivados de éste (EFSA, 2014).

Cifras similares ocurren en Chile, en el año 2013, se notificaron 1.096 brotes de ETA con 7.344 casos. En el 33,9% de ellos, se logró identificar el agente y de éstos, un 58,2% el agente identificado fue *Salmonella* spp. (MINSAL, 2013). Además, desde el año 2005 al 2010 se notificaron 87 brotes por *Salmonella* Enteritidis y entre los grupos de alimentos en los cuales se detectó este patógeno, un 4% correspondió a pescados y mariscos (Vaquero *et al.*, 2011). Por otro lado, entre el 2009 y 2010, se identificó *Salmonella* Enteritidis como principal agente etiológico de ETA, igual a lo que ocurre en países europeos (Olea *et al.*, 2012). En un estudio donde se analizó las bases de datos correspondientes a los serotipos de *Salmonella* spp. (origen clínico) recibidas por el Instituto de Salud Pública de Chile entre Enero de 2009 a Julio de 2014, se concluyó que el 65,3% de los serotipos confirmados correspondió a S. Enteritidis y el 12,7% a S. Typhimurium (MINSAL, 2014).

En cuanto a la transmisión de este patógeno a través de productos hidrobiológicos, *Salmonella* spp. ha sido identificada como la causa de diferentes brotes en Estados Unidos (EE.UU) y la Unión Europea (UE), como también en otros países a través del mundo. La administración de alimentos y medicamentos (FDA), ha demostrado la presencia de

Salmonella spp. en distintas variedades de peces, moluscos y crustáceos (Amagliani *et al.*, 2012).

Esta bacteria puede entrar en el ambiente acuático a través de animales salvajes, presencia de ganado, pobre sanitización o falta de higiene y también una inapropiada eliminación de los desechos humanos y animales (Amagliani *et al.*, 2012). Los peces, moluscos y crustáceos pueden adquirir este patógeno directamente del agua contaminada, como también durante el procesamiento y almacenamiento de los productos (Vidaček, 2014). Es importante mencionar que *Salmonella* puede sobrevivir por largos periodos de tiempo, inclusive años, en el ambiente acuático (Winfield *et al.*, 2003). Un estudio hecho en las playas de Barcelona entre 1980 y 1981, detectó la presencia de *Salmonella* spp. en un 22% de las muestras de agua tomadas, aislando 34 serotipos diferentes (Isern *et al.*, 1987).

Otro factor importante a tener en cuenta es que la producción global de peces, crustáceos y moluscos ha ido en continuo incremento desde finales de la década de los 70'. Al mismo tiempo el comercio internacional también ha aumentado durante las últimas tres décadas, incrementando desde US\$8 billones en 1976 a US\$102,5 billones en el 2010 (Vidaček, 2014). En Chile, se ha observado esta misma tendencia, con un crecimiento en la producción y exportaciones, siendo un país que destina la mayor parte de sus productos al comercio internacional. En el año 1970, se exportaron 132.179 toneladas de productos pesqueros por un valor de 29 millones de dólares, mientras que en el año 2013 se exportaron 1.163.177 toneladas con un valor de más de 4 billones de dólares (ODEPA, 2014).

Debido a la importancia que tiene *Salmonella* spp. como causante de ETA en todo el mundo, sumado al aumento de producción y demanda de productos hidrobiológicos, es fundamental contar con metodologías analíticas sensibles y específicas que protejan la salud de los consumidores, asegurando la entrega de productos inocuos. Para este propósito, el Ministerio de Economía, a través del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca), mantiene el control de los productos hidrobiológicos destinados a la exportación. Parte de este control se logra a través del Programa de Aseguramiento de la Calidad (PAC), que es un programa de certificación voluntario, basado en el concepto de análisis de peligros y control de puntos críticos (HACCP), al cual pueden optar todas las

plantas pesqueras y barcos factoría del país, que se hace obligatorio para las empresas que exportan a la Unión Europea y Estados Unidos.

Para este Programa de certificación, Sernapesca debe aprobar el plan de aseguramiento de calidad de la industria y supervisar su posterior funcionamiento a través de laboratorios autorizados por ellos. Estos laboratorios, verifican mediante el análisis de muestras, el correcto funcionamiento del PAC asociado a la línea de producción correspondiente (Sernapesca, 2014).

En este sentido, es importante que los resultados entregados por los laboratorios sean confiables. Por esto, es necesario que los análisis se realicen de acuerdo a normas reconocidas y validadas internacionalmente como ISO, ICMSF, FDA, AOAC y OIE. Además, existe la norma internacional ISO 16140-3, según la cual, para implementar un método de análisis estandarizado en un laboratorio, es necesario realizar un proceso de verificación. A través de dicho proceso, el laboratorio interesado en implementar una norma demuestra su capacidad para aplicar el método en las matrices de interés. El objetivo de esta norma es evaluar el rendimiento de un método, en un laboratorio en particular, contra las especificaciones del método establecidas durante la validación y además evaluar el rendimiento del método en las matrices incluidas en el alcance del método y probados rutinariamente en el laboratorio. En el proceso de verificación, a diferencia de la validación, no es necesario volver a evaluar todas las características del método, sino sólo aquellas que dependen del laboratorio en donde éste se va a implementar. Para métodos cualitativos, la característica relevante del desempeño de una prueba es el nivel de detección, que corresponde a la menor concentración de un microorganismo que puede ser determinado, con una probabilidad dada, bajo condiciones experimentales del método a evaluar.

El método usado actualmente en Chile para la detección de *Salmonella* spp. en productos hidrobiológicos, es la norma chilena Nch 2675.Of2002 (Productos Hidrobiológicos- Detección de *Salmonella*), basada en métodos de referencia, pero no cuenta con validación internacional. Por esta razón actualmente se están implementando las normas ISO, las cuales son reconocidas en la mayoría de los países. Para el caso de *Salmonella* spp. se utiliza la norma ISO 6579:2002 (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal

method for detection of *Salmonella* spp.), que corresponde a un método horizontal para la detección de este patógeno.

Ambos métodos se componen de 5 fases: i) preenriquecimiento en un medio líquido no selectivo; ii) enriquecimiento en un medio líquido selectivo; iii) siembra en placa e identificación presuntiva; iv) confirmación de identidad por bioquímica y v) confirmación de identidad serológica. Los resultados son expresados en términos cualitativos, es decir presencia o ausencia del patógeno en una determinada cantidad de muestra (ISO 6579:2002 y NCh 2675.Of2002).

En esta memoria de título se implementará y verificará la norma ISO 6579:2002 y la NCh 2675.Of2002 en dos matrices: salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y chorito (*Mytilus chilensis*). Esto, con el fin de demostrar la capacidad que tiene el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, de la Universidad de Chile, para realizar estos métodos en las matrices mencionadas. Esto permitirá la entrega de resultados confiables, siendo relevante en la entrega de alimentos inocuos para el consumo de las personas.

OBJETIVO GENERAL

Implementar dos métodos cualitativos para la detección de *Salmonella* spp. en productos hidrobiológicos

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar la norma ISO 6579:2002 en chorito (*Mytilus chilensis*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*).
2. Implementar la norma chilena NCh 2675.Of2002 chorito (*Mytilus chilensis*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*).
3. Verificar ambos métodos para las matrices alimentarias chorito (*Mytilus chilensis*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de acuerdo a la norma ISO 16140-3.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Este laboratorio, trabaja bajo un sistema de gestión basado en la norma ISO 17025 (Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración).

1. Normas de bioseguridad

Las normas de seguridad utilizadas en este estudio son las usadas en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Se trabajó bajo las condiciones descritas en el Manual de Normas de Bioseguridad de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), según el cual, *Salmonella* Typhimurium se describen como riesgo intermedio. Para trabajar con ellas, los procedimientos y técnicas a usar se deben hacer bajo un nivel de bioseguridad 2 (CONICYT, 2008).

2. Cepa bacteriana

La cepa corresponde a *Salmonella* Typhimurium, la cual proviene del cepario del Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos. La cepa fue identificada para género y especie por la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization). La identificación se basa en el análisis de proteínas, a través de la creación de un espectro de masas el que es específico para cada bacteria. Este análisis fue realizado por la unidad de Bacteriología del Instituto de Salud Pública de Chile.

3. Matrices alimentarias

Las matrices utilizadas fueron dos, chorito (*Mytilus chilensis*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Las muestras de salmón fueron proveídas por el Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, que corresponden a contramuestras del Programa de Aseguramiento de la Calidad (PAC). Las muestras de chorito fueron compradas congeladas en un supermercado de la Región Metropolitana. .

4. Implementación de metodologías

La implementación de las metodologías analíticas se hizo siguiendo los procedimientos descritos en la norma ISO 6579:2002 (Anexo 1) y la norma NCh 2675.Of2002 (Anexo 2). Para ambos, las muestras de 25 gramos fueron pre-enriquecidas con 225 mL de agua peptonada (AP) e incubadas a la temperatura correspondiente, para cada método. Luego, se realizó la etapa de enriquecimiento selectivo en dos medios líquidos. Uno de ellos, Rappaport-Vassiliadis con soya (caldo RVS), para ambos métodos y el segundo, caldo Muller-Kauffmann-Tetrionato-Novobiocina (caldo MKTTn) para la norma ISO 6579:2002 y caldo Selenito-Cistina (caldo SC), para la norma NCh 2675.Of2002. Posteriormente se llevó a cabo la etapa de aislamiento, en agar Xilosa Lisina Deoxicolato (XLD) y agar Salmonella-Shigella (SS). De cada medio selectivo sólido, dos colonias fueron confirmadas por técnica bioquímica. No se hizo confirmación serológica, ya que la cepa fue identificada previamente.

5. Verificación de las metodologías

La verificación de los métodos analíticos ISO 6579:2002 y NCh 2675.Of2002, implementados para las matrices alimentarias chorito (*Mytilus chilensis*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*) se realizó en base a la norma ISO/WD 16140-3; Microbiology of the food chain- Method validation- Part 3: Protocol for the verification of reference and alternative methods implemented in a single laboratory. Según esta norma, para métodos cualitativos, la característica relevante del desempeño de una prueba es el nivel de detección, que tiene que ser menor a 30 unidades formadoras de colonias (UFC) del patógeno por porción a analizar.

Según esta misma norma, las matrices deben ser representativas de lo que se analizará rutinariamente en el laboratorio. Además, se especifica que el número de muestras a analizar deben ser 10, con 2 controles negativos. En el caso de este estudio, se hizo un pool con las muestras, desde donde posteriormente se obtuvieron, las 10 muestras y los 2 controles negativos para cada método y matriz evaluada.

Según la norma ISO 16140-3 el criterio de aceptación para cada matriz, es la detección positiva de *Salmonella* Typhimurium en un 100% de las muestras inoculadas. En caso que

se detecte un porcentaje menor, se tiene que buscar las posibles causas de este resultado y se debe repetir el proceso de verificación.

5.1 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se utilizó criotubos que cepa pura de *Salmonella* Typhimurium y caldo glicerol, los cuales se mantienen almacenados a -20°C . Se descongeló a temperatura ambiente y se traspasó el contenido del criotubo a un tubo que contenía 3 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI). Este se incubó a 35°C por 24 h. Luego, se sembró por estría en un tubo que contenía 9 mL de Agar Trypticase Soya (TSA) preparado previamente de forma inclinada y se incubó a 35°C por 24 h. De este último tubo, se traspasó a través de un asa, la multiplicación superficial de las bacterias a un tubo que contenía 9 mL de agua peptonada. Se homogenizó el contenido.

Posteriormente, se verificó la absorbancia mediante un espectrofotómetro con una longitud de onda de 625 nm, la cual debe ser equivalente a 10^8 ufc/mL. Se debe repetir el procedimiento cuando sea necesario, hasta alcanzar dicha absorbancia. Una vez hecho esto, se realizan diluciones decimales traspasando 1 mL de cada tubo a otro que contiene 9 mL de agua peptonada, hasta llegar a la dilución teórica que contenga < 30 ufc/mL.

5.2 Determinación de la absorbancia específica para *Salmonella* Typhimurium

Para determinar la absorbancia específica de la suspensión de *Salmonella* Typhimurium, en la cual hay una concentración de 10^8 ufc/mL a una longitud de onda de 625 nm, se hicieron 10 suspensiones ajustadas al patrón estándar de turbidez 0.5 McFarland en tubos de ensayo con agua peptonada más la cepa. Posteriormente, se verificó la absorbancia del preparado, mediante un espectrofotómetro. Se calculó el promedio y la desviación estándar. Además, se calculó la absorbancia del agua peptonada sola, para comprobar que no afectara significativamente el valor de la absorbancia. Los resultados se pueden observar en la tabla 1.

Tabla 1. Absorbancias en espectrofotómetro a 625 nm, de 10 suspensiones de *S. Typhimurium* ajustadas a un patrón estándar de turbidez 0,5 McFarland.

| Suspensiones ajustadas a estándar de turbidez de 0,5 McFarland | Absorbancia a 625 nm |
|---|-----------------------------|
| 1 | 0,099 |
| 2 | 0,087 |
| 3 | 0,094 |
| 4 | 0,089 |
| 5 | 0,133 |
| 6 | 0,143 |
| 7 | 0,093 |
| 8 | 0,087 |
| 9 | 0,084 |
| 10 | 0,089 |
| Promedio | 0,099 |
| Desviación Estándar | 0,019 |

Se determinó que la absorbancia a 625 nm, debe estar entre 0,08 y 0,12. La absorbancia del AP fue de 0,001.

5.3. Contaminación de las muestras

Para la contaminación de las muestras, primero se pesan 25 gramos para cada método y matriz evaluada, esto se hace en bolsas para homogeneizador de laboratorio Stomacher. Posteriormente, se prepara el inóculo y se contaminan las 4 muestras con 1 mL de esta suspensión.

Paralelamente, se siembra 1 mL de la suspensión en profundidad y en duplicado en placas Petri con agar para recuento en placa. Estas se incuban a 37°C por 24 horas con el fin de verificar que el recuento promedio de los duplicados sea menor a 30 ufc/mL. Si hay un recuento mayor al esperado, esas muestras no se considerarán válidas.

En la tabla 2 se pueden observar el promedio de los resultados obtenidos de los recuentos en placa.

Tabla 2. Resultados obtenidos de los recuentos en placa de los inóculos con *S. Typhimurium*.

| Inóculo <i>S. Typhimurium</i> | Recuento en placa promedio (ufc/mL) |
|--------------------------------------|--|
| 1 | 26 |
| 2 | 18 |
| 3 | 10 |
| 4 | 15 |
| 5 | 8 |
| 6 | 12 |
| 7 | 22 |
| 8 | 16 |
| 9 | 20 |
| 10 | 14 |

RESULTADOS

Se evaluó si los métodos descritos en la norma ISO 6579:2002 y la norma NCh 2675.Of2002 pueden detectar un nivel suficientemente bajo de *Salmonella* Typhimurium en ambas matrices alimentarias y bajo las condiciones propias del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria. Para determinar esto, se inocularon las muestras con 1 mL de una suspensión con una concentración menor a 30 ufc/mL de la cepa previamente identificada por método MALDI-TOF. Se realizaron 2 pooles con las muestras de salmón del Atlántico y chorito respectivamente. Se analizaron 10 muestras por cada método y matriz evaluada con 2 controles negativos.

El criterio de aceptación para cada matriz correspondió a la detección positiva de *Salmonella* Typhimurium en un 100% de las muestras inoculadas.

1.1. Verificación norma ISO 6579:2002 en salmón del Atlántico (*Salmo salar*)

Los resultados obtenidos en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) analizados bajo la norma ISO 6579:2002 se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados obtenidos según norma ISO 6579:2002 en las muestras de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y de los controles negativos.

| Número de muestra | Resultado (Presencia/Ausencia) |
|-------------------|--------------------------------|
| 1 | Presencia |
| 2 | Presencia |
| 3 | Presencia |
| 4 | Presencia |
| 5 | Presencia |
| 6 | Presencia |
| 7 | Presencia |
| 8 | Presencia |
| 9 | Presencia |
| 10 | Presencia |
| C. Negativo 1 | Ausencia |
| C. Negativo 2 | Ausencia |

1.2. Verificación Norma ISO 6579:2002 en chorito (*Mytilus chilensis*)

Los resultados obtenidos en chorito (*Mytilus chilensis*) ISO analizados bajo la norma ISO 6579:2002 se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados obtenidos según norma ISO 6579:2002 en las muestras de chorito (*Mytilus chilensis*) y de los controles negativos.

| Número de muestra | Resultado (Presencia/Ausencia) |
|-------------------|--------------------------------|
| 1 | Presencia |
| 2 | Presencia |
| 3 | Presencia |
| 4 | Presencia |
| 5 | Presencia |
| 6 | Presencia |
| 7 | Presencia |
| 8 | Presencia |
| 9 | Presencia |
| 10 | Presencia |
| C. Negativo 1 | Ausencia |
| C. Negativo 2 | Ausencia |

1.3. Verificación norma NCh 2675.Of2002 en salmón del Atlántico (*Salmo salar*)

Los resultados obtenidos en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) analizados bajo la norma NCh 2675.Of2002 se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados obtenidos según norma NCh 2675.Of2002 en las muestras de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y de los controles negativos.

| Número de muestra | Resultado (Presencia/Ausencia) |
|-------------------|--------------------------------|
| 1 | Presencia |
| 2 | Presencia |
| 3 | Presencia |
| 4 | Presencia |
| 5 | Presencia |
| 6 | Presencia |
| 7 | Presencia |

| | |
|---------------|-----------|
| 8 | Presencia |
| 9 | Presencia |
| 10 | Presencia |
| C. Negativo 1 | Ausencia |
| C. Negativo 2 | Ausencia |

1.4. Verificación Norma NCh 2675.Of2002 en chorito (*Mytilus chilensis*)

Los resultados obtenidos en chorito (*Mytilus chilensis*) analizados bajo la norma chilena NCh 2675.Of2002 se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados obtenidos según norma Nch 2675.of2002 en las muestras de chorito (*Mytilus chilensis*) y de los controles negativos.

| Número de muestra | Resultado (Presencia/Ausencia) |
|-------------------|--------------------------------|
| 1 | Presencia |
| 2 | Presencia |
| 3 | Presencia |
| 4 | Presencia |
| 5 | Presencia |
| 6 | Presencia |
| 7 | Presencia |
| 8 | Presencia |
| 9 | Presencia |
| 10 | Presencia |
| C. Negativo 1 | Ausencia |
| C. Negativo 2 | Ausencia |

DISCUSIÓN

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) constituyen unos de los problemas de salud pública más importantes en el mundo. El género *Salmonella* spp. es el más relevante tomando en cuenta el número de casos y brotes. En Chile, Estados Unidos y la Unión Europea, se ha demostrado su presencia en productos hidrobiológicos, ya sea por contaminación primaria, o cruzada por la manipulación, almacenamiento y distribución de estos alimentos. Si bien no hay datos disponibles en Chile sobre la incidencia de *Salmonella* spp. patógenas para humanos en productos hidrobiológicos, datos del Departamento de Estadísticas e Información de Salud (DEIS) en lo que se refiere a porcentaje de brotes de ETA, según lugar de pérdida de la inocuidad, se indica que en la manipulación comercial y manipulación doméstica es donde más se contaminan los alimentos que consumimos, sumando entre ambos un 66,7% (MINSAL, 2016). Lo anteriormente descrito, sumado a que hay preparaciones como el sushi y el ceviche, donde no hay cocción del pescado previo al consumo, es que es de importancia el análisis periódico para detectar *Salmonella* spp. en éstos y otros productos.

En Chile, el mercado de la exportación de productos hidrobiológicos ha ido en constante aumento, pasando de exportar 132.179 toneladas en 1970, a 1.163.177 toneladas en el 2013. Los requisitos sanitarios para exportar productos alimenticios son cada vez más exigentes, por lo que los países exportadores deben asegurar un producto inocuo y de calidad. En este contexto, el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca) cumple un rol fundamental al ser el responsable de garantizar la calidad sanitaria de los productos pesqueros y de la acuicultura de exportación. Para este propósito, cuenta con su Programa de Aseguramiento de la Calidad (PAC). Parte de este programa, es el análisis periódico de estos alimentos, utilizando métodos de detección de patógenos que permitan demostrar resultados seguros y confiables, acorde a los estándares de los países importadores. Por esto, es que la utilización de normativa de referencia internacional, como las normas ISO, cobra una alta importancia debido a que son aceptadas en la mayor parte del mundo. En Chile, para la detección de *Salmonella* spp. en productos hidrobiológicos, la norma de referencia utilizada es la norma chilena Nch 2675.Of2002, la cual aunque está basada en una norma ISO, cambia un medio de enriquecimiento selectivo. Si bien, esta diferencia

desde el punto de vista técnico demostró no ser relevante en este estudio, hace que ambas normas ya no se consideren como equivalentes, por lo que la norma chilena no tiene la misma validez que la norma ISO fuera de Chile. Por consiguiente, la incorporación de metodología de referencia internacional, respaldaría de mejor forma la vigilancia que se está haciendo a los productos de exportación.

Aunque el método a utilizar haya pasado por un proceso de validación técnico, antes de la implementación de un método de detección microbiológica, es importante que se evalúe el rendimiento de este en cada laboratorio y para cada grupo de matrices a través de un proceso de verificación. Este proceso, asegura que los resultados que se obtengan al utilizar el método, estén acordes a los parámetros que se establecieron en el proceso de validación. El énfasis que se le otorga a que los resultados sean confiables, es debido a que en base a estos se toman decisiones que pueden afectar la salud de las personas, además de todas las repercusiones económicas que pueden significar para un país.

En el caso de este estudio, ambos métodos de detección cualitativos descritos en la norma ISO 6579:2002 y la norma chilena Nch 2675.Of2002, los cuales fueron implementados en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos (LIA), cumplieron los requisitos para ser verificados según lo descrito en la norma ISO 16140-3, para las matrices alimentarias, chorito y salmón del Atlántico. Estos dos productos alimenticios, se eligieron por ser representativos de los productos que se analizarán rutinariamente en el laboratorio, por lo que el LIA tendrá la facultad para realizar estos métodos de detección de *Salmonella* spp. en otros moluscos y pescados diferentes a chorito y salmón del Atlántico. En el caso que se requiera realizar estos métodos en grupos de alimentos diferentes, se tendrá que realizar un nuevo proceso de verificación para esas matrices. También, gracias a los resultados obtenidos en los controles negativos, se pudo determinar que la matriz inicial se encontraba libre de *Salmonella*. Asimismo, todos los recuentos que se hicieron paralelo al análisis de las muestras mostraron un recuento menor a 30 ufc/mL, lo que validó los resultados posteriormente obtenidos.

Es importante decir, que ambos métodos demostraron ser capaces de detectar una contaminación menor a 30 ufc por porción analítica, en el 100% de las muestras analizadas, por lo que en el caso de estas matrices y para el LIA, ambos métodos son equivalentes. Sin

embargo, en el caso del análisis de productos hidrobiológicos de exportación, se debe usar el método descrito en la norma ISO, debido al amplio y aceptado uso que tienen estas normas a nivel mundial.

CONCLUSIONES

- El método descrito en la norma ISO 6579:2002 implementado y verificado, en las matrices alimentarias salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y chorito (*Mytilus chilensis*) entregó resultados positivos en un 100% de los casos para la detección de *Salmonella* Typhimurium en ambas matrices, cumpliendo con los criterios descritos en la norma ISO 16140-3.
- El método descrito en la norma Nch 2675.Of2002 implementado y verificado, en las matrices alimentarias salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y chorito (*Mytilus chilensis*) entregó resultados positivos en un 100% de los casos para la detección de *Salmonella* Typhimurium en ambas matrices, cumpliendo con los criterios descritos en la norma ISO 16140-3.
- La verificación de ambos métodos implementados en estas matrices en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos, permite demostrar su capacidad en la entrega de resultados confiables en la detección de *Salmonella* spp. en productos hidrobiológicos.

BIBLIOGRAFIA

ACHA, P.; SZYFRES. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3a ed. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C, EUA. V. 1.

AMAGLIANI, G; BRANDI, G; SCHIAVANO. 2012. Incidence and role of Salmonella in seafood safety. Food Research International. (45) 780–788.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2012. Foodborne Diseases Active Surveillance Network. 36 p.

CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA. 2008. Manual de normas de bioseguridad. 2da ed. Santiago, Chile.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA Journal 12(2):1-250.

FICA, A.; ALEXANDRE, M.; PRAT, S.; FERNANDEZ, A.; FERNANDEZ, J.; HEITMANN, I. 2001. Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile. Desde *Salmonella typhi* a *Salmonella enteritidis*. Revista Chilena de Infectología 18 (2): 85-93.

FICA, A.; ACOSTA, G.; DABANCH, J.; PERRET C.; TORRES, M.; LOPEZ, J.; JOFRÉ L.; WEITZEL, T. 2012. Brotes de salmonelosis y el tamaño y rol del Estado en Chile. Revista Chilena de Infectología. 29 (2): 207-214.

HUSS, H; REILLY, A; EMBAREK, K. 2000. Prevention and control of hazards in seafood. Elsevier. (11) 149-156.

INN. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. Norma chilena Nch 2675.Of2002. Productos Hidrobiológicos – Detección de *Salmonella*. Chile, 2002. 31 p.

ISERN, A.; FERRER, M.; PÉREZ, F. 1987. Estudio de la *Salmonella* en el agua de mar de las playas de la ciudad de Barcelona. Gaceta Sanitaria. 1:118-22

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 16140-3. Microbiology of food chain- Method validation- Part 3: Protocol of verification of reference and alternative methods implemented in a single laboratory. Suiza, 2014. 6 p.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 17025. “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories”. Suiza, 2005. 6p.

MINISTERIO DE SALUD, CHILE. 2012. Boletín laboratorio y vigilancia al día, N° 15. <http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2012/06/BOLETIN%2015.pdf> [consulta: 10-02- 2015] > [consulta : 10-02- 2015]

MINISTERIO DE SALUD, CHILE. 2013. Enfermedades Entéricas: Informe de situación. 8p.

MINISTERIO DE SALUD, CHILE. 2014. Vigilancia Laboratorio: *Salmonella* spp. 2009-2014. 18p.

MINISTERIO DE SALUD, CHILE. 2016. Brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, Situación epidemiológica, Enero-Diciembre 2015. 7p

NCh. NORMA CHILENA OFICIAL. NCh 2675.Of2002. Productos Hidrobiológicos - Detección de *Salmonella*.

ODEPA. 2014. Sector pesquero: evolución de sus desembarques, uso y exportación en las últimas décadas. [en línea]. <http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1392915533Sectorpesca201402.pdf> [consulta: 10-02- 2015]

OLEA, A.; DÍAZ, J.; FUENTES, R.; VAQUERO A.; GARCÍA, M. 2012. Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. Revista Chilena Infectología 129 (5): 504-510.

- RETAMAL, P.; ABALOS, P.; FREDES, F.** 2010. Enfermedades Animales Producidas por Agentes Biológicos. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 266 p.
- RAY, B.** 2004. Fundamental Food Microbiology. 3a ed. CRC PRESS. Florida, Estados Unidos. 594 p.
- RYAN, K.; RAY, G.** 2011. Sherris, Microbiología Médica. 5a ed. McGraw-Hill Interamericana. México, D. F., México. 776 p.
- SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.; ANGULO, F.; TAUXE, R.; WIDDOWSON, M.; ROY, S.; JONES, J.; GRIFFIN, P.** 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States-Major Pathogens. Emerging Infectious Diseases Journal. 17(1): 7-15.
- SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA.** 2014. Programa de aseguramiento de calidad. Manual de procedimientos, sección 1.
- VAQUERO, A.; FERNÁNDEZ, A.; DÍAZ, J.** 2011. Informe *Salmonella* Enteritidis. [en línea]. http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Salmonella/Informe_Salmonella_2011.pdf [consulta: 28-11- 2015]
- VIDAČEK, S.** Seafood. En: Food Safety Management: A Practical Guide for the Food Industry. London. Elsevier. 2014. pp. 189- 211.
- WINFIELD, M; GROISMAN, E.** 2003. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 69(7):3687.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2013. *Salmonella* (non-typhoidal), Fact sheet. [en línea]. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>> [consulta: 28-03- 2015]

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de Bioseguridad



CERTIFICADO N° 78

Santiago, 30 de Junio del 2016

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado proyecto de memoria de título: "Implementación y verificación de 2 métodos cuantitativos para la detección de *Salmonella* spp en productos hidrobiológicos" cuya profesora guía es la Dra. Pilar Oviedo, académica de FAVET.

El proyecto se llevará a cabo en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile (FAVET).

- 1.- El Personal recibirá una inducción en normas de bioseguridad. Se utilizará vestimenta adecuada para realizar el trabajo en el laboratorio, delantal, gafas, guantes etc. Restricción de acceso al laboratorio.
- 2.- Se trabajará bajo campana de bioseguridad, utilizando desinfectantes adecuados.
- 3.- Todos los materiales utilizados, serán descontaminados mediante autoclave previo a su uso y antes de ser eliminados.

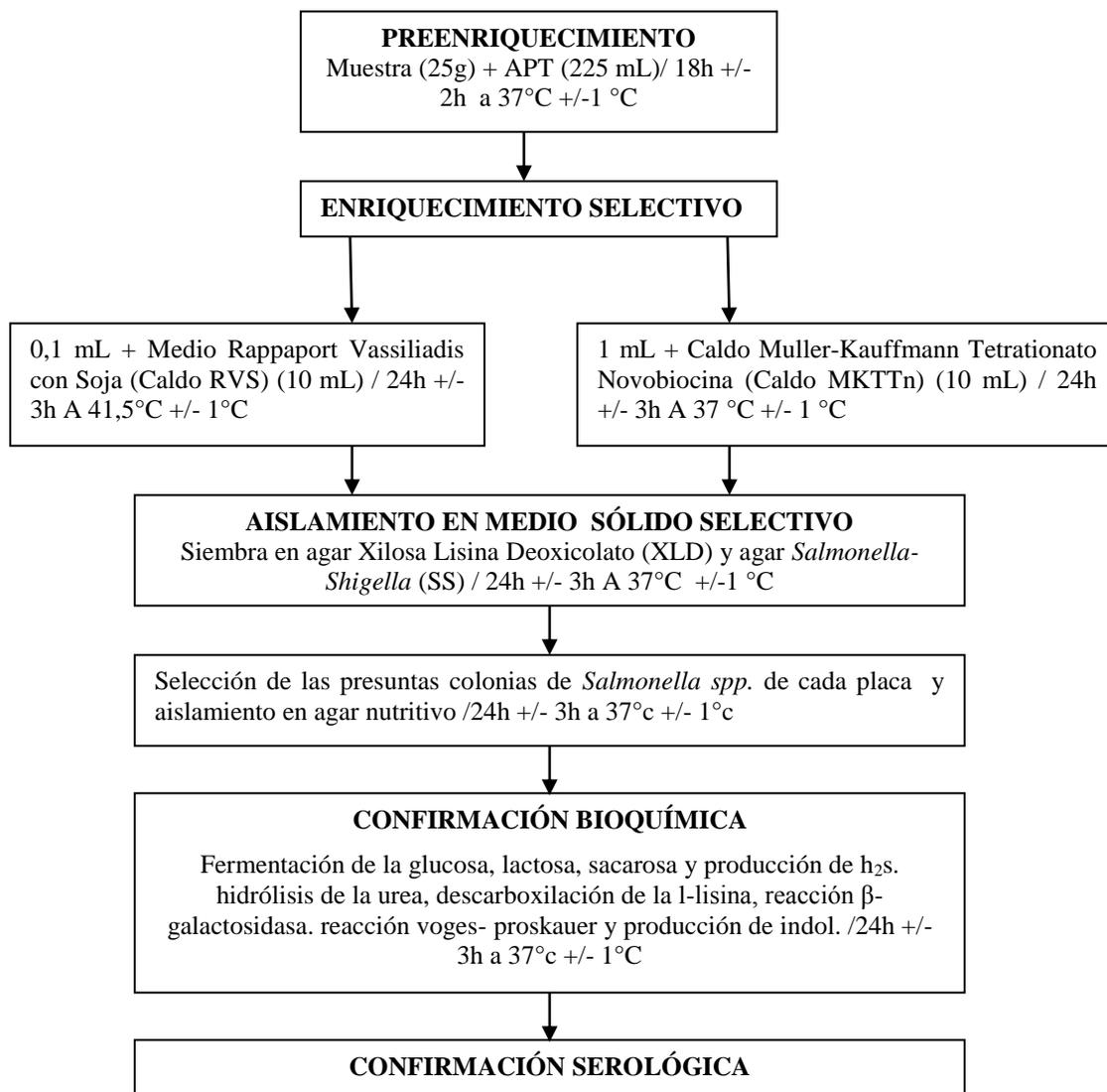
Este proyecto está actualmente siendo revisado por el comité de bioseguridad en base a las especificaciones contenidas en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)" y el Manual de Bioseguridad de Conicyt (versión 2008), que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

Coordinadora
Comité de Bioseguridad

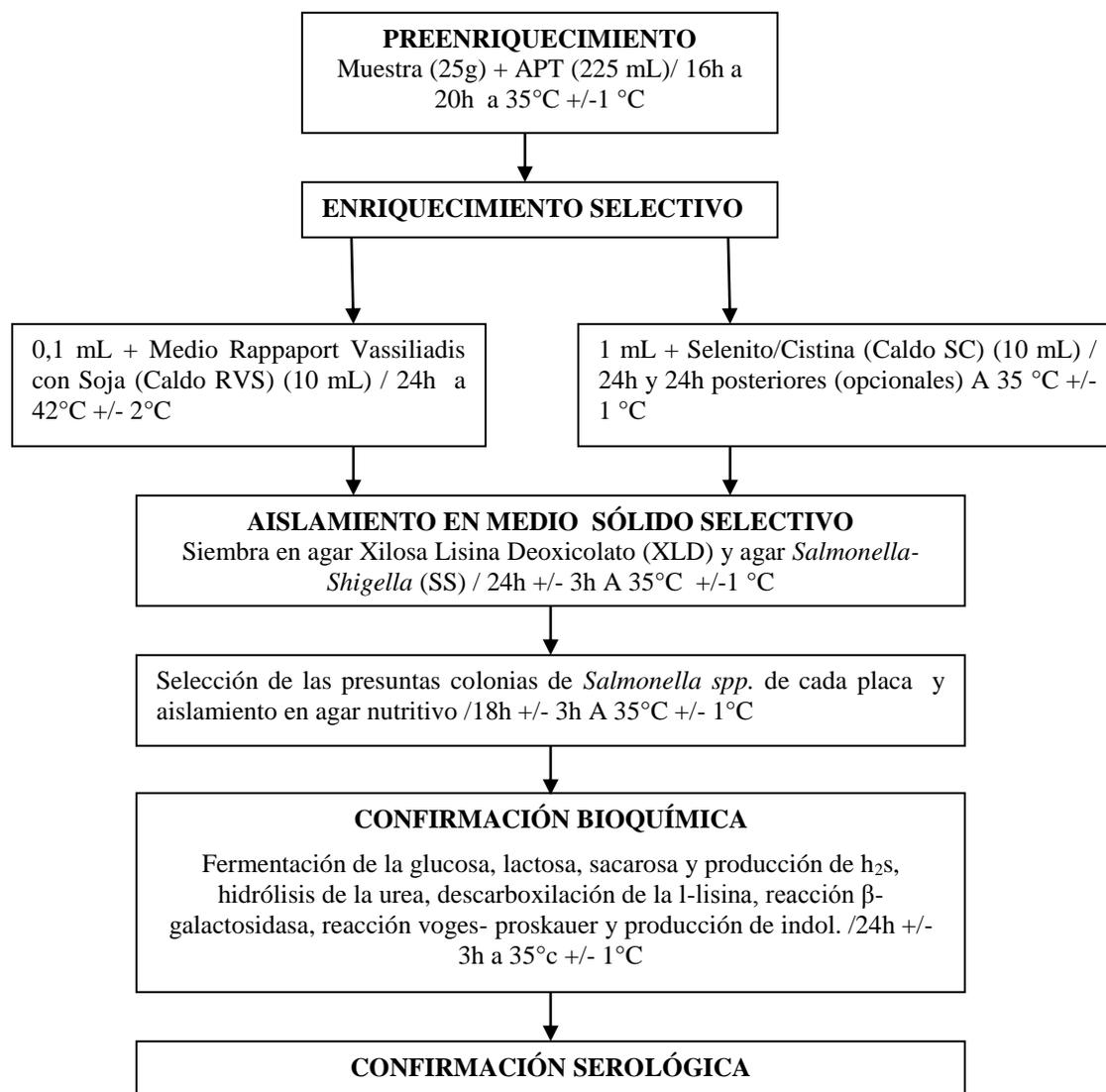


Anexo 2. Método para detección de *Salmonella* spp. según norma ISO 6579:2002.



Fuente: norma ISO 6579: 2002 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection of *Salmonella* spp.”

Anexo 3. Método para detección de *Salmonella* spp. según norma Nch 2675.Of2002.



Fuente: norma Nch 2675.Of2002 “Productos hidrobiológicos- Detección de *Salmonella*”.