



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ISO 6579:2002 PARA
LA DETECCIÓN DE Salmonella spp. EN MATRIZ PRE-MEZCLA
ACUÍCOLA**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

AUTOR

Hurtado Salirrosas, Soledad Patricia

ASESOR

Mg. Yupanqui Siccha, Gisela

JURADO

Mg. Casaverde Río, Milvio

Mg. Salas Asencios, Ramsés

Mg. Flores Anchorena, Juan

Blga. Bravo Cruz, Nora

LIMA - PERÚ

2018

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios y a mis padres. A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, a mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad.

AGRADECIMIENTO

Los resultados de esta tesis, están dedicados a todas aquellas personas que, de alguna forma, son parte de su culminación.

A mi familia por siempre brindarme su apoyo y comprensión a lo largo de todos estos años.

Mis sinceros agradecimientos están dirigidos hacia la compañía Certificaciones del Perú S.A. por permitir el uso de sus instalaciones para la realización de esta tesis.

A todos los docentes que he tenido a lo largo de toda esta magnífica carrera, en especial a la Mg. Gisela Yupanqui Siccha por creer en mí; aun sin haberme enseñado y decirme que sería microbióloga, y mírenme ahora.

A mis grandes amigas Luz Toribio y Cynthia Rodríguez, que no solo han sido los mejores 5 años de carrera universitaria sino de una gran amistad.

A mis ex compañeras de trabajo y amigas, Vanezza Correa, Cinthya Carrión y Gabriela Iglesias por aceptarme y enseñarme todo lo que se ahora.

A mis amigos del alma Luis Mariñas y William Espinola por sus años de amistad y comprensión de esta difícil carrera.

Gracias Dios, gracias padres y gracias hermanos.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	07
ABSTRACT	08
1. INTRODUCCIÓN	09
1.1 Objetivos	10
1.1.1 Objetivo General	10
1.1.2 Objetivos Específicos	10
2. MARCO TEÓRICO	11
2.1 Antecedentes	11
2.2 Generalidades	11
2.2.1 Género <i>Salmonella</i>	11
2.2.1.1 Caracterización Microbiológicas Generales	11
2.2.1.2 Propiedades Biológicas	15
2.2.1.3 Propiedades Bioquímicas	15
2.2.1.4 Estructura Antigénica	16
2.2.1.5 Aspectos Epidemiológicos	17
2.2.2 Pre-mezclas para acuicultura	18
2.2.3 Implementación	19
2.2.4 ISO 6579:2002	19
2.2.5 Validación	20
2.2.5.1 Tipos de Validación	20
2.2.5.1.1 Validación Primaria	20
2.2.5.1.2 Validación Secundaria	20
2.2.5.2 Tipos de Métodos	21
2.2.5.2.1 Métodos no Normalizados	21
2.2.5.2.2 Métodos Normalizados	21

2.2.5.2.3 Métodos Cualitativos	22
2.2.5.2.4 Métodos Cuantitativos	22
2.2.5.2.3 Métodos Semi-cuantitativos	22
2.2.5.3 Etapas del Proceso de Validación	22
2.2.6 Sensibilidad	23
2.2.7 Especificidad	24
2.2.8 Exactitud relativa	25
2.2.9 Límite de detección	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Preparación de Muestra	26
3.2 Determinación de la Concentración del Microorganismo	26
3.3 Inoculación de Muestras de Pre-mezcla Acuícola	27
3.4 Detección de <i>Salmonella</i> spp.	27
3.4.1 Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo	27
3.4.2 Enriquecimiento en medios líquidos selectivos	28
3.4.3 Cultivos en placa e identificación	29
3.4.4 Pruebas Confirmatorias	29
3.4.4.1 Agar Triple Azúcar Hierro (Agar TSI)	29
3.4.4.2 Agar Urea	30
3.4.4.3 Medio para descarboxilación de l-lisina	30
3.4.4.4 Detección de β -galactosidasa	30
3.4.4.5 Medio para reacción Voges-Proskauer (VP)	31
3.4.4.6 Medio para reacción Indol	31
3.4.4.7 Confirmación serológica	31
3.4.4.7.1 Eliminación de cepas autoaglutinables	31
3.4.4.7.2 Determinación del antígeno O	32
3.4.4.7.3 Determinación del antígeno Vi	32
3.4.4.7.4 Determinación del antígeno H	32
3.5 Determinación del Límite de detección	32
3.6 Técnicas de Análisis y Procesamientos de Datos	33

4. RESULTADOS	34
4.1 Determinación de la Concentración del Microorganismo	34
4.2 Detección de <i>Salmonella</i> spp.	34
4.3 Determinación del Límite de Detección	42
5. DISCUSIÓN	44
6. CONCLUSIONES	46
7. RECOMENDACIONES	48
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
9. ANEXOS	54

RESUMEN

La *Salmonella* es el género bacteriano responsable de la mayor cantidad de caso de enfermedades entéricas, tanto en los seres humanos como en animales. Anualmente la Organización Mundial de la Salud reporta millones de casos asociados a este género bacteriano. La normativa peruana asociada a la detección de *Salmonella* spp. en productos hidrobiológicos es la ISO 6579:2002.

El presente estudio tiene como finalidad implementar y validar el método de ensayo para la detección de *Salmonella* spp. en la matriz pre-mezcla acuícola en el laboratorio Certificaciones del Perú S.A. La validación de la metodología se llevó a cabo, siguiendo lo descrito en la norma ISO 16140-2. Se usó las cepas de *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y *Escherichia coli*.

En la implementación y validación, se logró detectar en un 100% al patógeno en las muestras contaminadas en el laboratorio, cumpliendo con los criterios de las normas ISO 6579:2002 e ISO 16140-2.

Los resultados obtenidos permite determinar que el laboratorio tiene la capacidad para realizar el método de ensayo en la matriz implementada, con resultados confiables en la detección de *Salmonella* spp.

Palabras Claves: *Salmonella* spp., implementación, validación, ISO 6579:2002

ABSTRACT

Salmonella Spp. is one of the main causes of the disease in both humans and animals, the WHO has estimated tens of millions of cases occurs in the world every year. In Peru, the reference standard for the detection of *Salmonella* spp. in hydrobiological products is the ISO 6579: 2002.

The purpose of this study is to implement and validate the assay method for the detection of *Salmonella* spp. in the pre-mixed aquaculture matrix in the laboratory Certificaciones del Perú S.A. Validation of the methodology was carried out, following the procedure described in ISO 16140-2. The strains of *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* and *Escherichia coli* were used.

In the implementation and validation, it was possible to detect 100% of the pathogen in the samples contaminated in the laboratory, complying with the criteria of ISO 6579: 2002 and ISO 16140-2 standards.

The results allowed to determine that the laboratory has the capacity to perform the test method in the matrix implemented, the reliable results in the detection of *Salmonella* spp.

Keywords: *Salmonella* spp., implementation, validation, ISO 6579:2002

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) causan un gran interés en los estudios del cuidado de la salud pública debido a los daños y consecuencias que generan a salud de la población.

La salmonelosis es una de las enfermedades gastroentéricas que tienen mayor incidencia mundial; su contagio es frecuente debido a la dieta basada principalmente en la ingesta de alimentos de origen animal que son sensibles a contaminarse.

En los últimos años los productos pesqueros, en especial la acuicultura, han aumentado su producción mundial; permitiendo así que nuevas industrias como los piensos y pre-mezclas vitaminadas aumenten su producción. Los piensos son todo material simple o compuesto, ya sea elaborado, semielaborado o sin elaborar, que se emplea directamente en la alimentación de animales destinados al consumo humano. Las pre-mezclas son mezclas uniformes de uno o más micro ingredientes o aditivos con un diluyente o vehículo para facilitar su distribución equitativa en una mezcla más grande. (FAO e IFIF, 2014)

La inocuidad de estas materias primas es de gran importancia tanto para el sector de producción, como el sector de exportación. FAO, 2002; determina que el principal motivo de preocupación respecto de la inocuidad de la utilización de la harina de pescado y piensos para los seres humanos ha sido siempre y sigue siendo la contaminación de *Salmonella*.

Para el análisis de *Salmonella* spp. en productos hidrobiológicos actualmente en el Perú utiliza la Norma ISO 6579:2002, este método para detección de *Salmonella* spp. es aplicables para productos destinados al consumo humano y alimentación de animales, con este método horizontal, la mayoría de los serovares de *Salmonella* están destinados a ser detectados.

El presente trabajo tiene como objetivo implementar y validar la sensibilidad del método ISO 6579-2002 para la detección de *Salmonella* spp. en matriz pre-mezcla acuícola, así como la mínima concentración detectada del patógeno en dicha matriz.

1.1 Objetivos:

1.1.1 Objetivo General:

Implementar y validar la sensibilidad del método ISO 6579-2002 para la detección de *Salmonella* spp. en matriz pre-mezcla acuícola.

1.1.2 Objetivos Específicos:

- Determinar la concentración de microorganismos a ser inoculados en las muestras de pre-mezcla acuícola.
- Inocular las muestras de pre-mezcla acuícola con cepas de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*.
- Aplicar la metodología ISO 6579:2002 para la detección de *Salmonella* spp.
- Aislar e identificar mediante pruebas bioquímicas y serológicas, las colonias de *Salmonella* spp. recuperadas de las muestras inoculadas.
- Evaluar los resultados mediante pruebas de veracidad y precisión.
- Encontrar la sensibilidad y especificidad de los resultados a obtener.
- Estimar el límite de detección de *Salmonella* spp. en pre-mezclas acuícolas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

Fresquet, 2002; especifica que el primer aislamiento de grupo *Salmonella* fue en 1884 por Gaffky (1850 – 1918), y dos años después en 1886 Theobald Smith (1859 – 1934) describió las características del género de bacterias aisladas de cerdos con cólera. El género recibe su nombre del patólogo Daniel Elmer Salmon (1850 – 1914), administrador del programa de investigación del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

Andrews et al., 2014. Describe que el método tradicional para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos utilizado en el Laboratorio de Microbiología de las Secretarías Regionales Ministeriales (SEREMI) de salud de la Región Metropolitana (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) pre-enriquecimiento no selectivo, ii) enriquecimiento selectivo, iii) siembra e identificación y iv) confirmación de identidad. Los resultados obtenidos fueron de tipo cualitativo, es decir, presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en 25 g. de alimento.

Cortes et al., 2002; determina que validar es demostrar con un alto grado de confianza, por medio de evidencia documentada que un proceso específico producirá de forma consistente productos que reunirán las características de calidad predefinidas.

ENAC, 2002; menciona que validar ofrece evidencia de que un método es capaz de servir para su propósito planeado, para tal fin se deben reflejar las condiciones reales de ensayo, esto puede obtenerse empleando productos inoculados con un número conocido de microorganismo.

OMS, 2013; promueve el fortalecimiento de los sistemas de inocuidad de los alimentos, las buenas prácticas de elaboración y la información de los vendedores y consumidores acerca de la adecuada manipulación de los alimentos, y la prevención de la contaminación. La información de los consumidores y la capacitación de los manipuladores de alimentos para la manipulación segura de los productos son algunos de los medios más eficaces para prevenir enfermedades de transmisión alimentaria, entre ellas la salmonelosis. Por medio de la Red Mundial sobre Infecciones de Transmisión Alimentaria, la OMS refuerza y mejora las capacidades de los laboratorios nacionales y regionales en lo relativo a la vigilancia de la *Salmonella* y de otros patógenos de transmisión alimentaria, y a la resistencia de *Salmonella* y *Campylobacter* a los antimicrobianos en las personas, alimentos y animales.

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

FAO, 2002; determina que el principal motivo de preocupación respecto de la inocuidad de la utilización de la harina de pescado para los seres humanos ha sido siempre y sigue siendo la contaminación de *Salmonella*. Antes de su comercialización, la harina de pescado es objeto de un muestreo y un análisis de detección de *Salmonella*. Su presencia puede dar lugar a la contaminación de animales y productos lácteos, que a su vez

pueden causar la salmonelosis, una infección transmitida por los alimentos que puede ser grave para los seres humanos, especialmente para los ancianos y los niños pequeños. Además, algunas especies de *Salmonella* causan enfermedades dañinas para la ganadería.

Ewing WH, 1986, menciona que *Salmonella*, causa la fiebre tifoidea y la fiebre paratifoidea contamina los moluscos a través de las heces humanas, incluidas las aguas fecales, cuando en una población local hay personas que excretan bacterias, bien en casos clínicos o de portadores. Las otras especies que causan gastroenteritis están asociadas tanto a heces humanas como animales. *Salmonella* presenta diferencias en cuanto a la especificidad del hospedero; mientras algunos serovares no tienen una estricta adaptación a un huésped, esta capacidad de no tener una estricta adaptación produce enfermedades con características diferentes en el hombre y en las diferentes especies animales.

2.2 GENERALIDADES

2.2.1 Género *Salmonella*

2.2.1.1 Caracterización Microbiológicas Generales

“El género *Salmonella* se encuentra dentro de la familia Enterobacteriaceae, integrada por bacterias gram negativas no esporuladas, con forma de bacilos que miden entre 0.5 a 0.8 micras de ancho por 1 – 3 micras de largo, habitualmente móviles mediante flagelos peritricos, aunque existen mutantes inmóviles”. **(Gómez L., 1980)**

“De metabolismo anaerobios facultativos, con la capacidad de fermentar glucosa con producción de gas, pero no fermentan la lactosa. Reducen los nitratos en nitritos. Forman colonias típicas sobre medios de cultivo

sólidos y poseen características bioquímicas y serológicas definidas”.
(Del Rosario y Vicente, 2000)

“El género *Salmonella* tiene la capacidad de crecer bien en medios de cultivo que no requieren la adición de elementos nutricionales específicos. Se cultivan bien a un pH entre 6 y 8 con una temperatura óptima de 37°C, pero también se pueden cultivar entre 6 y 46°C”.
(Zapatero, 1974; Gómez L., 1980)

A temperaturas inferiores a 10°C el crecimiento sufre un retraso considerable comparado a su temperatura óptima de crecimiento; además de que su crecimiento podría detenerse a temperaturas menores a 7°C. **(Odumeru y León-Velarde, 2012)**

En medios líquidos, los gérmenes en fase lisa dan cultivos rápidos con un crecimiento entre 18 a 24 horas, que enturbian el medio y forman un ligero velo en la superficie. Cuando se encuentran en fase rugosa producen un depósito granuloso con líquido claro sobrenadante.

Las cepas tipo silvestre de las especies de *Salmonella*, *E. coli* y otras bacterias gram negativas capaces de sintetizar moléculas de lipopolisacárido completas se denominan cepas lisas, por su morfología colonial. Estos organismos reaccionan con anticuerpos específicos contra sus cadenas O, y usualmente forman colonias de apariencia lisa cuando crecen en medios sólidos. En contraste, las cepas incapaces de sintetizar polisacárido O son llamadas “rugosas”, dado que en la mayoría de los casos exhiben una morfología colonial rugosa. **(Rick P., 1987)**

En agar nutritivo a las 18 – 24 horas, forman colonias redondeadas entre 2 – 4 mm de diámetro. Las colonias pueden ser plano – convexas, húmedas y de superficie lisa y brillante (Fase Lisa); o colonias irregulares, planas, mates y rugosas (Fase rugosa). **(Gómez L., 1980; Le Minor, 1984)**

Las colonias de *Salmonella* en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) son de color rosado, pudiendo presentar o no un centro negro debido a la producción de ácido sulfhídrico (H₂S). **(Department of Veterinary Disease Biology, University of Copenhagen, 2011)**

En agar sulfito bismuto las colonias de *Salmonella* son de color negro, con brillo metálico, algunas especies de *salmonella* presentan color negro o verde. **(Gómez L., 1980)**

2.2.1.2 Propiedades Biológicas

Las salmonellas presentan una marcada resistencia a las condiciones ambientales. Resisten al frío y a la congelación, en el hielo y en la nieve persisten viables más de tres meses. **(Gómez L., 1980)**

En el agua pueden sobrevivir durante 2 a 3 semanas y persisten aún más tiempo si ésta contiene materia orgánica en suspensión. **(Gómez L., 1980)** Son resistentes a la desecación, lo cual explica su supervivencia en el suelo y en el lodo hasta por seis semanas. **(Zapatero, 1974)**

2.2.1.3 Propiedades Bioquímicas

El género *Salmonella* fermenta glucosa con producción de gas, no fermenta lactosa ni sacarosa; producen de forma irregular el ácido sulfhídrico (H₂S) en el agar Triple azúcar hierro (TSI), no hidrolisan urea, no produce indol, ni β-galactosidasa y generalmente descarboxila la lisina **(ISO 6579, 2002)**.

En la tabla 1, se observan las características bioquímicas de las diferentes especies y subespecies de *Salmonella*; y sus diversas pruebas bioquímicas. **(Ewing WH y Ball MM, 1996)**

Tabla 01. Interpretación de pruebas bioquímicas del género *Salmonella*. (Ewing WH y Ball MM, 1996)

Test	CEPA SALMONELLA									
	<i>S. typhi</i>		<i>S. paratyphi A</i>		<i>S. paratyphi B</i>		<i>S. paratyphi C</i>		Otras cepas	
	Reacción	% ^b	Reacción	% ^b	Reacción	% ^c	Reacción	% ^c	Reacción	% ^b
Ácido de glucosa en TSI	+	100	+	100	+		+		+	100
Gas de glucosa en TSI	- ^d	0	+	100	+		+		+	92
Ácido de lactosa en TSI	-	2	-	100	-		-		-	1
Ácido de sacarosa en TSI	-	0	-	0	-		-		-	1
Producción de H ₂ S en TSI	+	97	-	10	+		+		+	92
Hidrólisis de urea	-	0	-	0	-		-		-	1
Descarboxilación de lisina	+	98	-	0	+		+		+	95
Reacción β-galactosidasa	-	0	-	0	-		-		-	2 ^e
Reacción Voges-proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Producción de Indol	-	0	-	0	-		-		-	1

b Estos porcentajes indican que no todos los aislamientos de serotipo *Salmonella* muestran reacciones marcadas + o -, estos porcentajes pueden variar dentro de un mismo serotipo y entre un serotipo y otro de los causantes de intoxicaciones alimentarias de diferentes procedencias.

c Los porcentajes no son conocidos en literatura disponible.

d *Salmonella typhi* es anaerogénica.

e *Salmonella enterica* sub. *arizonae* da una reacción de lactosa positiva o negativa, pero es siempre β-galactosidasa positiva. Para el estudio de estas cepas puede ser útil llevar a cabo pruebas complementarias.

2.2.1.4 Estructura Antigénica

Los antígenos somáticos están compuestos por complejos de fosfolípidos y polisacáridos. Son cadenas laterales de polisacáridos de lipopolisacáridos de pared celular (LPS) que se encuentran en la

membrana externa de las bacterias gram negativas y que actúan como una barrera de protección contra agentes externos. El flagelo es una estructura compleja y sensible al calor, que consiste en un cuerpo basal, un segmento de unión (“hook”) y un filamento. **(Maloy et al., 1996)** El antígeno capsular Vi se encuentra sólo en *S. typhi*, *S. paratyphi C* y en algunas cepas de *S dublin*. La fórmula antigénica de todos los serotipos de *Salmonella*, son definidos, condensados y mantenidos por el “Centro Colaborador de la organización mundial de la Salud de referencia e identificación de *Salmonella*”, del Instituto Pasteur de París, y los nuevos serotipos son listados en suplementos anuales del esquema de Kauffmann-White. **(Popoff y Le Minor, 1997, Popoff et al., 2001)**

2.2.1.5 Aspectos Epidemiológicos

Salmonella es un género que se encuentra altamente distribuido en la naturaleza, tanto como comensal y patógeno; la *Salmonella* normalmente está presente en las aves y los animales domésticos y muchos son excretadores asintomáticos de *Salmonella*. Por tanto, la carne cruda de dichos animales y aves a menudo está contaminada por este organismo. La gran mayoría de los brotes de enfermedades de origen hídrico están asociados al género *Salmonella*, y a su capacidad de adaptarse a diferentes ambientes acuáticos (agua fresca, aguas servidas, agua dulce y agua salada); además de poder ser aislados de alimentos de origen hidrobiológico. **(Palacios et al., 1999)**

La contaminación del pescado con *Salmonella* debido a su proliferación en aguas costeras contaminadas ha sido un problema en muchas partes del mundo. En algunos estudios se han presentado pruebas de que los camarones cultivados en el trópico frecuentemente contienen *Salmonella*. No obstante, se ha demostrado que la *Salmonella* en los productos del camarón de acuicultura se origina a partir del medio ambiente, más que como resultado de condiciones deficientes de

higiene y saneamiento, y de la utilización del estiércol de ave como pienso. **(Reilly et al., 1992)** La mayoría de los langostinos y los camarones se cocinan antes de su consumo y, por lo tanto, estos productos representan riesgos mínimos para la salud del consumidor, excepto por contaminación cruzada post-elaboración en cocinas. **(Ahmed, 1991)**

Salmonella es el patógeno responsable de diferentes infecciones intestinales, conocidas como salmonelosis; la salmonelosis puede dividirse en tres síndromes: el primero la fiebre entérica causada por la especie *Salmonella typhi*, el segundo la fiebre paratifoidea causada por la especie *Salmonella paratyphi* A, B o C y el tercero la gastroenteritis o envenenamiento por alimentos causada por las especies *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*. La infección por *Salmonella* se presentan en fases, la puerta de entrada del patógeno es la vía digestiva, donde la bacteria tiene la capacidad de sobrepasar la barrera defensiva representada por la acidez gástrica antes de adherirse e invadir las células del epitelio intestinal y penetrar por medio de ciertos genes de virulencia en su interior, donde se multiplica y produce alteraciones histopatológicas. **(Baümler, 1997; Millemann, 1998)**

Mediante el Sistema de Vigilancia Epidemiológica, entre los años 2010 al 2012 en el Perú se han reportado un promedio de 35 brotes de ETA por año, 47 % de los cuales se relacionaron clínicamente con casos agudos de salmonelosis. El total de personas afectadas fueron 2800 y, el 51% de los brotes reportados tuvieron entre 10 a 50 afectados en promedio. **(Ministerio de Salud, 2012)**

2.2.2 Premezclas para acuicultura

Mezcla uniforme de uno o más microingredientes con excipientes, que se utiliza para facilitar la dispersión uniforme de los microingredientes en

una cantidad grande de otro material o producto alimenticio. **(AAFCO, 2000)**

La premezcla son medicamentos veterinarios preparados con anticipación con miras a la fabricación subsiguiente de piensos medicados. Deben usarse solamente suplementos y premezclas que se hayan formulado específicamente para cada especie o categoría de animales. **(FAO, 2014)**

2.2.3 Implementación

La Implementación es poner en funcionamiento, aplicar métodos o medidas para llevar a cabo un proceso. **(ISO 9000:2000)**

Los laboratorios de análisis microbiológicos deben realizar la implementación de métodos microbiológicos verificados, validados y ajustados a condiciones de confiabilidad y competitividad.

2.2.4 ISO 6579:2002

El método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. es aplicables para productos destinados al consumo humano y alimentación de animales, muestras ambientales en el ámbito de la producción de alimentos y la manipulación de alimentos y muestras de la fase de producción primaria, tales como heces de animales, polvo y frotis. Con este método horizontal, la mayoría de los serovares de *Salmonella* están destinados a ser detectados. Para la detección de algunos serovares específicos, pueden ser necesarios pasos de cultivo adicionales.

2.2.5 Validación

La validación es la confirmación y provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos para un uso o aplicación prevista. **(ISO 9000:2000)**

La validación es el conjunto de procesos que se realizan cuando se pone en marcha una técnica analítica en un laboratorio de ensayo. El objetivo de la validación es garantizar que los métodos cumplen con criterios preestablecidos de precisión, exactitud, etc. La validación para la norma ISO 6579-2002 está en función a los criterios de sensibilidad, especificidad y exactitud.

2.2.5.1 Tipos de Validación

2.2.5.1.1 Validación Primaria

La validación primaria es un proceso exploratorio que tiene como meta establecer los límites operacionales y las características de desempeño de un método nuevo, modificado o caracterizado en forma inadecuada. Debe dar origen a especificaciones numéricas y descriptivas para el desempeño e incluir una descripción detallada y precisa del objetivo de interés. La validación primaria va precedida de la elaboración de un esquema de ensayo especialmente diseñado. Corresponde con la validación inicial que deben llevar acabo los laboratorios y casas comerciales que diseñan un equipo de diagnóstico, una prueba nueva o la unión en un solo protocolo de varios métodos normalizados o no. **(Camaró et al., 2013)**

2.2.5.1.2 Validación Secundaria

La validación secundaria también es denominada como revalidación, validación parcial o verificación. La validación secundaria se realiza

cuando un laboratorio procede a implementar un método desarrollado en otra parte. Esta validación se centra en la reunión de evidencias acerca de que el laboratorio está capacitado para cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria. Algunos organismos le denominan verificación y es la confirmación, mediante el aporte de pruebas objetivas, de que se cumplen los requisitos establecidos en las condiciones de uso de ese laboratorio. **(Camaró et al., 2013)**

La validación secundaria debe cumplir con las características descritas en el método de ensayo, estas características son: precisión, exactitud, sensibilidad, especificidad, límite de detección y/o cuantificación, etc.

2.2.5.2 Tipos de Métodos

2.2.5.2.1 Métodos no Normalizados

Corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados. **(Camaró et al., 2013)**

2.2.5.2.2 Métodos Normalizados

Método apropiado para el ensayo dentro de un alcance, publicado por organismos de normalización internacional, nacional o regional como la International Organization for Standardization (ISO), el Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM), el Instituto Alemán de Normalización (DIN), American Society for Testing and Materials (ASTM), British Standards Institution (BSI), etc.; o por organizaciones reconocidas en diferentes ámbitos como

la Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Environmental Protection Agency (EPA), United States Pharmacopeia (USP), etc.

2.2.5.2.3 Métodos Cualitativos

Son aquellos en los que se pretende detectar la existencia o ausencia de un microorganismo determinado, claramente especificado y en una porción de muestra. **(Camaró et al., 2013)**

Los parámetros a evaluar en este tipo de métodos son el límite de detección, precisión, exactitud, selectividad, especificidad, falsos positivos/negativos, sensibilidad y eficiencia.

2.2.5.2.4 Métodos Cuantitativos

Son aquellos en los que se desea indicar el número de unidades formadoras de colonia en una cantidad de sustancia, realizando un conteo concreto. Su objetivo es detectar un valor numérico de un agente infeccioso en una muestra. **(Camaró et al., 2013)**

Los parámetros estadísticos que se evalúan en estos métodos son la linealidad, rango de trabajo, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, selectividad, especificidad e incertidumbre.

2.2.5.2.3 Métodos Semi-cuantitativos

Son aquellos en los que se indica el número de microorganismos en una cantidad de muestra determinada, teniendo en cuenta la estadística, como por ejemplo el método del número más probables (NMP). **(Camaró et al., 2013)**

2.2.5.3 Etapas del Proceso de Validación

- a. Conocer el problema analítico a resolver.
- b. Planificar las acciones a seguir.
- c. Llevar a cabo la validación y evaluar los resultados obtenidos, por comparación con los parámetros establecidos.
- d. Realizar el informe de validación.

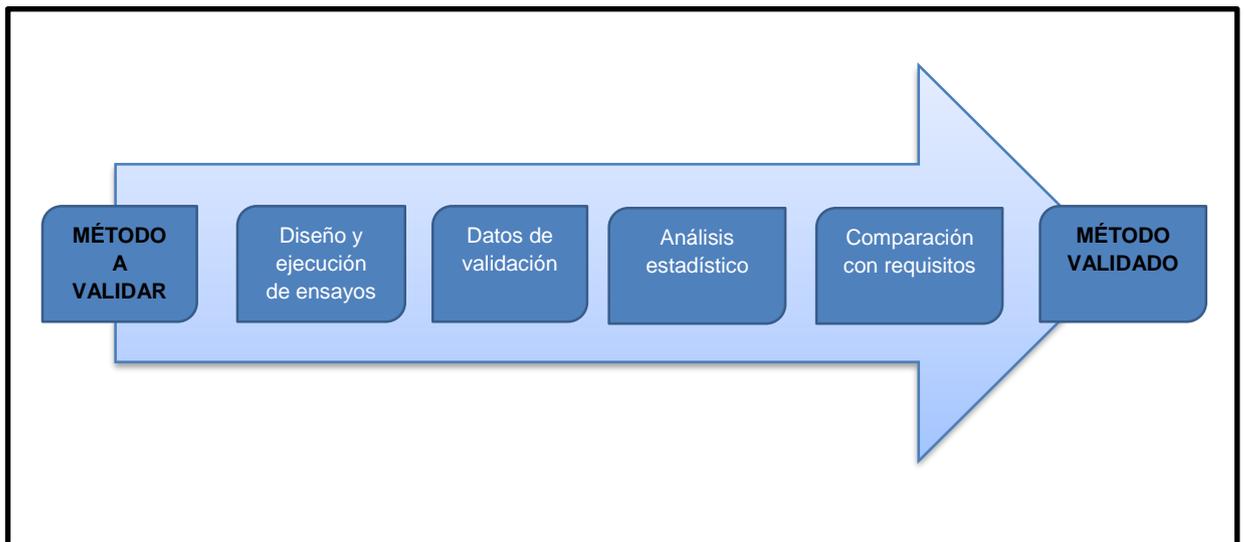


Fig. 01. Fases del proceso de Validación

2.2.6 Sensibilidad

Fracción del número total de cultivos o colonias positivos que son correctamente asignados con el método utilizado. **(Norma ISO/TR 13843)**

Es la proporción de muestras que contienen el analito investigado y responden positivamente al método.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a+b}$$

a: n° de presuntivos positivos encontrados como positivos (verdaderos positivos)

b: n° de presuntivos negativos encontrados como positivos (falsos negativos)

2.2.7 Especificidad

Capacidad del método para detectar la gama requerida de microorganismos que podrían estar presentes en la muestra (**Norma ISO/TR 13843**).

Es la fracción total del número de resultados negativos asignados correctamente con el método utilizado. La especificidad se refiere a la capacidad de un ensayo de detectar sólo el objetivo pretendido y que la cuantificación de la diana no se debe ver afectada por reactividad cruzada de otros analitos relacionados o potencialmente interferentes (**Camaró et al., 2013**).

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{c+d}$$

c: n° de presuntivos positivos encontrados como negativos (falsos positivos)

d: n° de presuntivos negativos encontrados como negativos (verdaderos negativos)

Tabla 02. Cálculo de Parámetros de Validación de Métodos Cualitativos. (Camaró et al., 2013).

		MÉTODO A VALIDAR		
		MUESTRA +	MUESTRA -	
REFERENCIA	+	A	b	a + b
	-	C	d	c + d
		a + b	b + d	N = a+b+c+d

2.2.8 Exactitud relativa

Es el grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia reconocido. **(Norma ISO 16140: 2016)**

2.2.9 Límite de detección

Es el número más bajo de microorganismos que se pueden detectar, pero en cantidades que no pueden estimarse exactamente. **(EA Guide EA-04/10: 2002)**

En el caso de los cultivos microbiológicos, el número mínimo de microorganismos que pueden ser detectados en una cantidad de muestra con una probabilidad dada, pero en cantidades que no pueden ser claramente cuantificadas. Se aplica generalmente a métodos cualitativos. Su estimación deberá realizarse sobre muestras naturales con carga baja del microorganismo a estudiar o, en su defecto, con muestras inoculadas preferiblemente no esterilizadas para que exista microbiota interferente **(Camaró et al., 2013)**.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación de Muestra

Se tomaron muestras de pre-mezcla acuícola de diferentes plantas industriales procesadoras de las localidades de Huarmey e Ilo, las muestras fueron codificadas, procesadas e inoculadas en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Empresa Certificaciones del Perú (CERPER); 21 de las muestras fueron inoculadas con cepas de *Salmonella entérica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y *Escherichia coli*, en las instalaciones del laboratorio y 21 de las muestras no inoculadas para la matriz.

3.2 Determinación de la Concentración del Microorganismo

Se obtuvieron cultivos de 24 horas de las cepas de *Salmonella enterica* (ML-01), *Salmonella typhi* (ML-09), *Salmonella paratyphi* (ML-21) y *Escherichia coli* (ML-27) en 3ml de caldo BHI, se utilizó para la siembra un asa de 1uL a partir de una cepa de trabajo en refrigeración a 4°C. A partir del cultivo de 24 horas, se tomó 1 mL del cultivo y se realizó una serie de diluciones decimales (-5, -6, -7, -8) y se procedió a sembrar en agar plate count para determinar el recuento en UFC/mL, las placas de plate count se incubaron a 30°C por 48h. Se repitió estos pasos antes descritos tres veces para cada microorganismo a ensayar y se calculó el promedio de los resultados para estimar la concentración del microorganismo a las 24 horas.



1

2

3

FIG. 02: Determinación de la concentración: 1: Diluciones decimales de las cepas ML-01, ML-09, ML-21 y ML-27, 2: Procedimiento de recuento en placa con Agar Plae Count, 3: Recuento de las cepas

3.3 Inoculación de Muestras de Pre-mezcla Acuícola

Para detección de patógenos; se pesaron 6 muestras de 100 g de la matriz de pre-mezcla acuícola, cada una fue inoculada con 50 mL de un cultivo mixto de *S. enterica*, *S. typhi* y *S. paratyphi* con una concentración aproximada de 100 UFC/mL y de el microorganismo no objetivo *E. coli* con una concentración aproximada de 1000 UFC/mL.

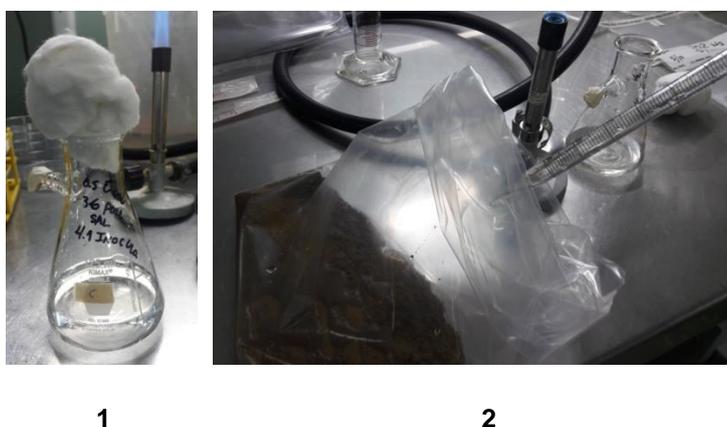


FIG. 03: Inoculación de muestras: 1: Preparación del inoculo de las cepas ML-01, ML-09, ML-21 y ML-27, 2: Procedimiento de inoculación de la pre-mezcla

3.4 Detección de *Salmonella* spp.

3.4.1 Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo

De las 6 muestras de 100 g inoculadas con el método descrito anteriormente, se pesaron 21 muestras de 25 g de pre-mezcla acuícola en bolsas stand-up, y se agregaron 225 mL de agua peptona taponada (APT). Además se pesaron 21 muestras de 25 g de pre-mezcla acuícola sin inocular en bolsas stand-up y se agregaron 225 mL de agua peptona taponada.

El Agua peptona taponada se incubó a temperatura ambiente con la muestra, luego se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18 \text{ horas} \pm 2 \text{ horas}$.

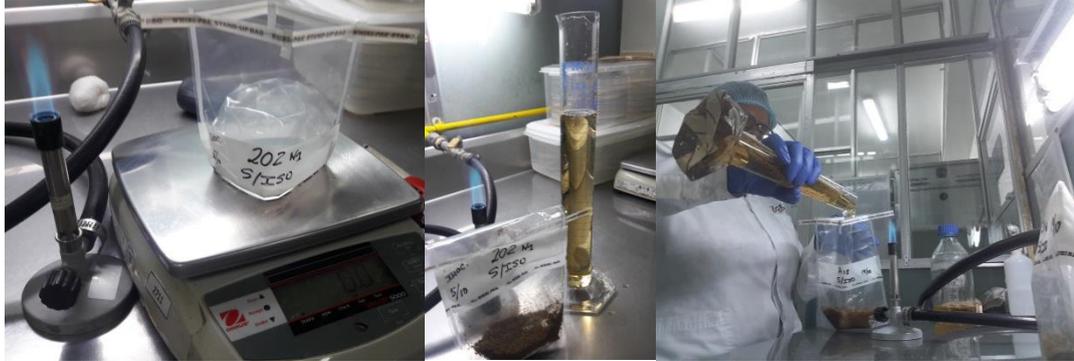


FIG. 04: Procedimiento de Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo

3.4.2 Enriquecimiento en medios líquidos selectivos

Se transfirió 0.1 mL del cultivo obtenido de APT a un tubo con 10 mL del medio Rappaport-Vassiliadis con soya (Caldo RVS); el caldo RVS inoculado se incubó en baño de agua a $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. En un tubo de 10ml de caldo tetrionato Muller-Kauffmann/novobiocina (Caldo MKTTn) se transfirió 1 ml del cultivo de APT y fue incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas.



1

2

3

FIG. 05: Enriquecimiento en medios líquidos selectivos: 1- 2: preparación de medios selectivos, 3: Inoculación de medios selectivos.

3.4.3 Cultivos en placa e identificación

De los cultivos obtenidos de los caldos RVS y MKTTn se inocularon en dos medios sólidos selectivos, en el agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) y agar sulfito bismuto (SB). El agar XLD se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y se examinó a las 24 ± 3 horas; y el agar SB se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y se examinó a las 48 ± 3 horas.



FIG. 06: Cultivo en placa e incubación

3.4.4 Pruebas Confirmatorias

Las colonias presuntivas de *Salmonella*, obtenidas después de la siembra en placas, fueron subcultivadas en Agar nutritivo e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 3 horas. De las placas de agar nutritivo se realizaron la identificación mediante pruebas bioquímicas y serológicas apropiadas.

3.4.4.1 Agar Triple Azúcar Hierro (Agar TSI)

Por medio de un alambre de inoculación se hizo una punción en el fondo y se estrió en el pico de flauta. Se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 3 horas. **(Norma ISO 6579, 2002)**

Fondo:

- Amarillo: glucosa positivo
- Rojo o sin cambio: glucosa negativo

- Negro: formación de H₂S
- Burbujas o ruptura de agar: formación de gas a partir de la glucosa.

Pico de flauta:

- Amarillo: lactosa y/o sacarosa positivo
- Rojo o sin cambio: lactosa y/o sacarosa negativo

3.4.4.2 Agar Urea

Con una aguja de inoculación se estrió en el pico de flauta y se incubo a 37°C ± 1 °C por 24 ± 3 horas y se examinaron en intervalos.

Reacción positiva: por hidrólisis de la urea se libera amonio que vira el color del indicador rojo de fenol a rosa y luego a color cereza. La reacción generalmente aparece después de 2 a 4 horas.

3.4.4.3 Medio para descarboxilación de l-lisina

A partir de un cultivo puro se inoculo con una aguja de inoculación por debajo de la superficie del caldo. Se incubo a 37°C ± 1 °C por 24 ± 3 horas.

Reacción positiva: color violeta

Reacción negativa: coloración amarilla

3.4.4.4 Detección de β-galactosidasa

Se suspendió una asada de la colonia sospechosa en un tubo que contenía 0.20 mL de solución salina y se agregó un disco de O.N.P.G. (ortho-Nitrophenyl-β-galactoside). Se incubo a 37°C ± 1 °C por 24 ± 3 horas.

Reacción Positiva: observación de color amarillo en la suspensión.

Reacción Negativa: la suspensión permanece sin cambio de color.

3.4.4.5 Medio para reacción Voges-Proskauer (VP)

Se resuspendió una asada de la colonia sospechosa en un tubo estéril con 3 mL de caldo VP, se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 3 horas, después de la incubación se agregaron 2 gotas de solución de creatinina, 3 gotas de la solución etanólica de 1-naftol y 2 gotas de la solución de KOH, agitando después de agregar cada reactivo.

Reacción Positiva: formación de un color rosado a un color rojo brillante dentro de 15 minutos.

3.4.4.6 Medio para reacción Indol

Se resuspendió una asada de la colonia sospechosa en un tubo estéril con 5 mL de caldo triptona-triptofano. Se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 3 horas. Después de la incubación se agregó 1 mL de reactivo de Kovacs (Anexo 2.11.2).

Reacción Positiva: formación de un anillo rojo

Reacción Negativa: formación de un anillo amarillo – marrón.

3.4.4.7 Confirmación serológica

3.4.4.7.1 Eliminación de cepas autoaglutinables

Se colocó una gota de solución salina en una placa de vidrio, con un asa se dispersó parte de la colonia para obtener una suspensión turbia y homogénea. Se movió la placa de vidrio en círculos por 30 a 60 segundos.

Si la cepa aglutina se considera autoaglutinable y no se somete a la determinación serológica.

3.4.4.7.2 Determinación del antígeno O

Se colocó una gota del suero anti O en una placa de vidrio, con un asa se dispersó parte de la colonia para obtener una suspensión turbia y homogénea. Se movió la placa de vidrio en círculos por 30 a 60 segundos.

Si se observa aglutinación la reacción es considerada positiva.

3.4.4.7.3 Determinación del antígeno Vi

Se colocó una gota del suero anti Vi en una placa de vidrio, con un asa se dispersó parte de la colonia para obtener una suspensión turbia y homogénea. Se movió la placa de vidrio en círculos por 30 a 60 segundos.

Si se observa aglutinación la reacción es considerada positiva.

3.4.4.7.4 Determinación del antígeno H

Se inoculó un agar nutritivo semisólido con el cultivo puro, se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 3 horas. Se utilizó este cultivo para determinar el antígeno H.

Se colocó una gota del suero anti H en una placa de vidrio, con un asa se dispersó parte de la colonia para obtener una suspensión turbia y homogénea. Se movió la placa de vidrio en círculos por 30 a 60 segundos.

Si se observa aglutinación la reacción es considerada positiva.

3.5 Determinación del Límite de detección

Se empleó la dilución 10^{-7} para la evaluación de límite de detección, agregando diferentes concentraciones de UFC como se describe en la

Tabla 01; en muestras de 25 gramos de pre-mezcla acuicola. Se procedió con todos los pasos empleados en la detección de *Salmonella* spp.

Tabla 03. Concentración de *Salmonella* spp. a inocular

CONCENTRACIÓN	INOCULO
50 UFC/mL	500 µl (0.5 mL)
25 UFC/mL	250 µl (0.25 mL)
10 UFC/mL	100 µl (0.10 mL)
1 UFC/mL	10 µl

3.6 Técnicas de Análisis y Procesamientos de Datos

Los resultados obtenidos en la detección de *Salmonella* spp. fueron evaluados estadísticamente mediante pruebas de veracidad y precisión que se confirmaron mediante la exactitud relativa que es el grado de concordancia entre los resultados esperados (muestra inoculada: resultado esperado positivo, muestra no inoculada: resultado esperado negativo) y los resultados obtenidos (Ausencia (-) y Presencia (+)), en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.

La sensibilidad y especificidad se evaluará verificando la proporción de verdaderos positivos y la proporción de verdaderos negativos, determinando que su p-value sea mayor a 0.05, con lo cual se podrá determinar que al 95% de confianza el método es sensible y específico.

4. RESULTADOS

4.1 Determinación de la Concentración del Microorganismo

La concentración de la cepa de *Salmonella enterica* (ML-01) fue de 77×10^7 UFC/mL, de la cepa de *Salmonella typhi* (ML-09) fue de 89×10^6 UFC/mL, de la cepa de *Salmonella paratyphi* (ML-21) fue de 38×10^6 y de la cepa de *Escherichia coli* fue de 70×10^7 .

En la Tabla 04 se observan los valores obtenidos en los tres recuentos sucesivos de las cepas que fueron inoculadas.

Tabla 04. Recuento en UFC/mL de las cepas de Trabajo

	ML-27	ML-01	ML-09	ML-21
1er. Recuento	66×10^7	70×10^7	89×10^6	36×10^6
2do. Recuento	74×10^7	86×10^7	94×10^6	41×10^6
3er. Recuento	69×10^7	75×10^7	85×10^6	38×10^6
PROMEDIO UFC/mL	70×10^7	77×10^7	89×10^6	38×10^6

4.2 Detección de *Salmonella* spp.

Las 21 de las muestras que fueron inoculadas con cepas de *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y *Escherichia coli*, dieron como resultado Presencia/25g, cumpliendo con sus respectivas pruebas bioquímicas y serológicas; y las 21 de las muestras no inoculadas para la matriz dieron como resultado Ausencia/25g.

En la Tabla 05 se expresan los resultados obtenidos entre los analistas, además de la cantidad de muestras inoculadas y no inoculadas ensayadas.

Tabla 05. Resultados obtenidos en la implementación del método de *Salmonella*

Nro.	Analista	Muestra	Salmonella/25g
1	1	No Inoculada	Ausencia
2	1	No Inoculada	Ausencia
3	1	Inoculada	Presencia
4	1	Inoculada	Presencia
5	1	Inoculada	Presencia
6	1	No Inoculada	Ausencia
7	2	No Inoculada	Ausencia
8	2	Inoculada	Presencia
9	2	No Inoculada	Ausencia
10	2	Inoculada	Presencia
11	2	No Inoculada	Ausencia
12	2	Inoculada	Presencia
13	3	Inoculada	Presencia
14	3	Inoculada	Presencia
15	3	No Inoculada	Ausencia
16	3	No Inoculada	Ausencia
17	3	No Inoculada	Ausencia
18	3	Inoculada	Presencia
19	4	No Inoculada	Ausencia
20	4	Inoculada	Presencia
21	4	Inoculada	Presencia
22	4	No Inoculada	Ausencia
23	4	No Inoculada	Ausencia
24	4	Inoculada	Presencia
25	5	Inoculada	Presencia
26	5	No Inoculada	Ausencia
27	5	No Inoculada	Ausencia
28	5	Inoculada	Presencia
29	5	Inoculada	Presencia
30	5	No Inoculada	Ausencia
31	6	Inoculada	Presencia
32	6	Inoculada	Presencia
33	6	No Inoculada	Ausencia
34	6	Inoculada	Presencia
35	6	No Inoculada	Ausencia
36	6	No Inoculada	Ausencia
37	7	No Inoculada	Ausencia
38	7	No Inoculada	Ausencia
39	7	Inoculada	Presencia
40	7	Inoculada	Presencia
41	7	Inoculada	Presencia
42	7	No Inoculada	Ausencia

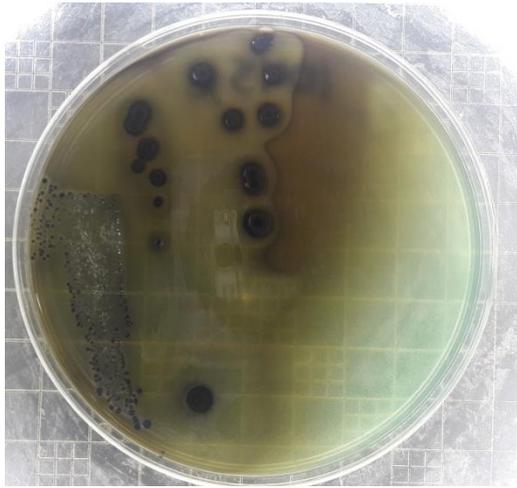


Fig. 07 Colonias típicas *Salmonella enterica* en placa de agar Sulfito Bismuto y XLD

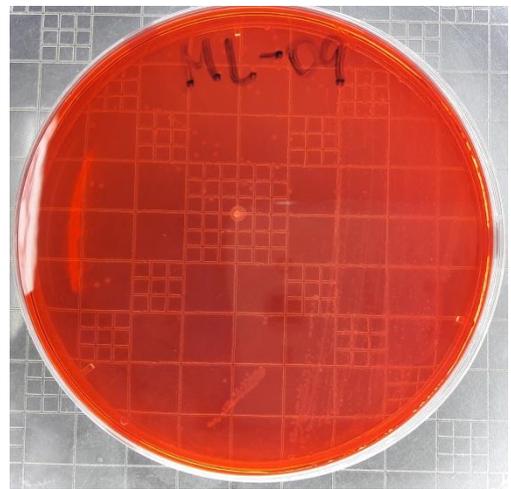
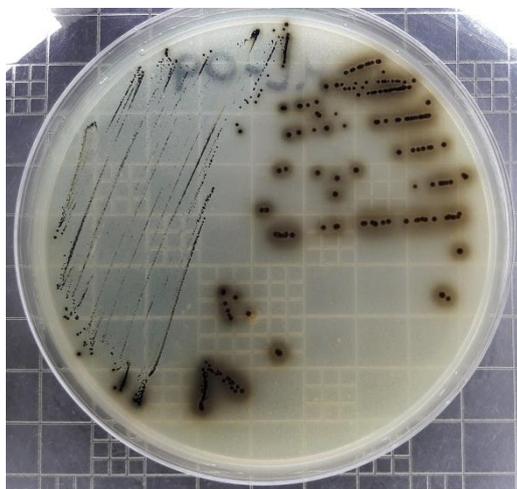


Fig. 08 Colonias típicas *Salmonella typhi* en placa de agar Sulfito Bismuto y XLD

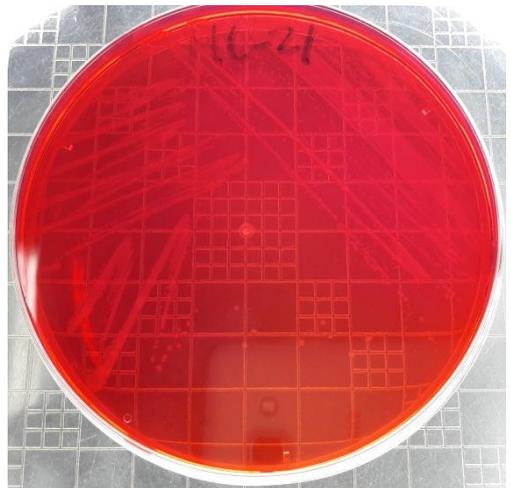
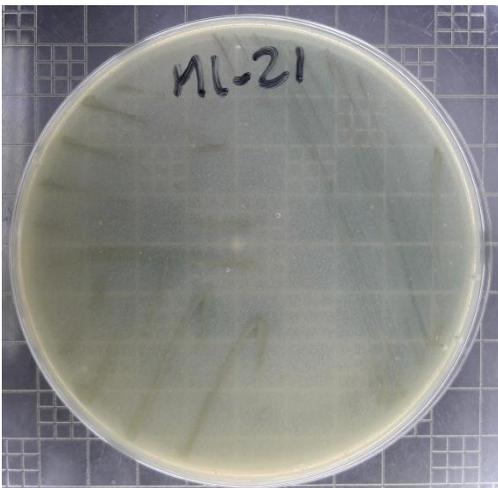


Fig. 09 Colonias típicas *Salmonella paratyphi* en placa de agar Sulfito Bismuto y XLD

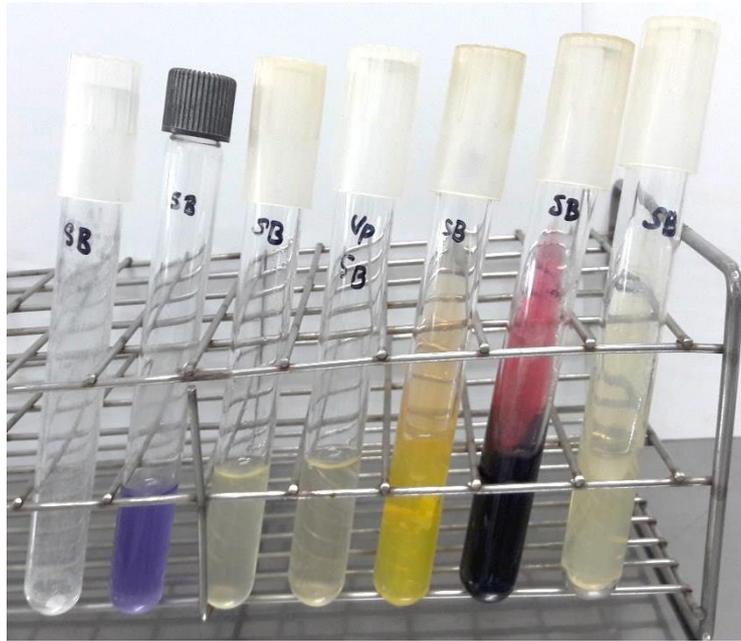
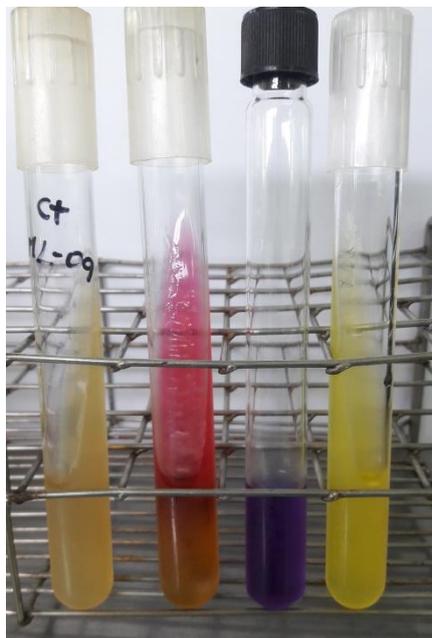


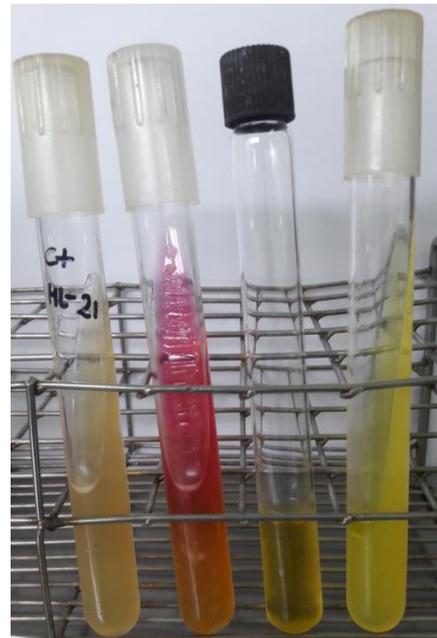
Fig. 10 Pruebas Bioquímicas de *Salmonella enterica*

Tabla 6. Pruebas Bioquímicas de *Salmonella enterica*

TSI	L-lisina	Agar Urea	Voges-Proskauer	Indol	B-galactosidasa
K/A ++	+	-	-	-	-



1



2

Fig. 11 Pruebas Bioquímicas de 1: *Salmonella typhi*, 2: *Salmonella paratyphi*

Tabla 7. Pruebas Bioquímicas de *Salmonella typhi*

TSI	L-lisina	Agar Urea	Voges-Proskauer	Indol	B-galactosidasa
K/A ++	+	-	-	-	-

Tabla 8. Pruebas Bioquímicas de *Salmonella paratyphi*

TSI	L-lisina	Agar Urea	Voges-Proskauer	Indol	B-galactosidasa
K/A - +	-	-	-	-	-

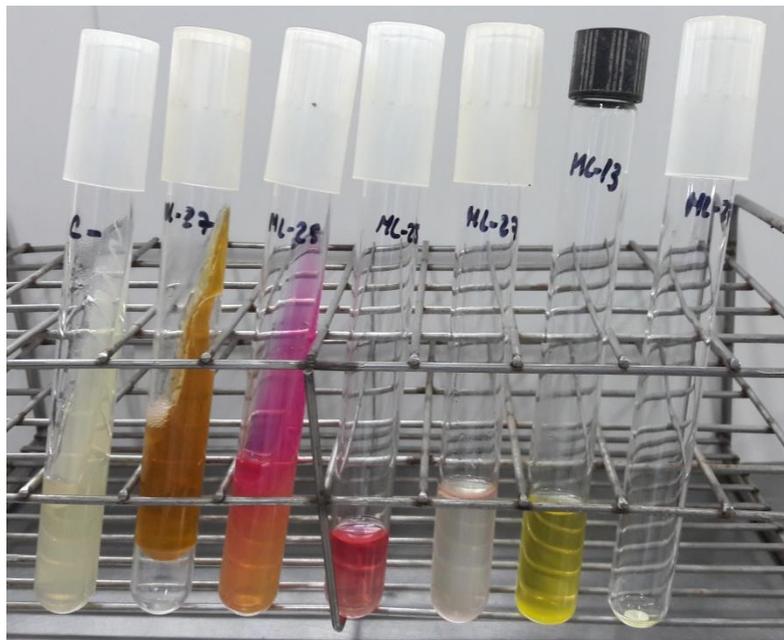


Fig. 12 Pruebas Bioquímicas de control negativo

Tabla 9. Pruebas Bioquímicas de control negativo

TSI	L-lisina	Agar Urea	Voges-Proskauer	Indol	B-galactosidasa
A/A ++	-	+	+	+	+



Fig. 13 Prueba serológica Poly O de *Salmonella enterica*



Fig. 14 Prueba serológica Vi de *Salmonella enterica*

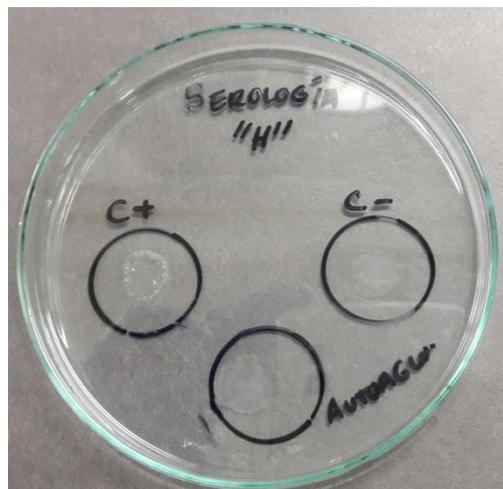


Fig. 15 Prueba serológica Poly H de *Salmonella enterica*

Tabla 10. Pruebas Serológicas de *Salmonella* spp.

CEPA	Antígeno "O"	Antígeno "Vi"	Antígeno "H"
<i>Salmonella enterica</i>	+	-	+
<i>Salmonella typhi</i>	+	+	+
<i>Salmonella paratyphi</i>	+	-	+

La Tabla 11 expresa los valores teóricos que se emplearon para hallar los valores estadísticos y la Tabla 12 contiene los valores obtenidos después de la realización del ensayo de *Salmonella*.

Tabla 11. Tabla de Contingencia Teórica

Resultados del método	Resultados esperados		Total
	Positivo (Inoculado)	Negativo (No inoculado)	
Positivo (Detectado)	N_{11}	N_{12}	$N_{11}+N_{12}$
Negativo (No detectado)	N_{21}	N_{22}	$N_{21}+N_{22}$
Total	$N+ = N_{11}+N_{21}$	$N- = N_{12}+ N_{22}$	N

Tabla 12. Tabla de Contingencia Experimental

Resultados del método	Resultados esperados		Total
	Positivo (Inoculado)	Negativo (No inoculado)	
Positivo (Detectado)	21	0	21
Negativo (No detectado)	0	21	21
Total	21	21	42

La sensibilidad fue verificada con la proporción de verdaderos positivos (PVP) mediante la prueba binomial con un valor del 100%, teniendo una p-value de 1.000. La proporción de falsos negativos fue de 0%.

La Tabla 13 expresa el porcentaje de verdaderos positivos obtenido.

Tabla 13. Proporción de Verdaderos Positivos

	Verdaderos positivos (N_{11})	21
	Positivos esperados (N_+)	21
SENSIBILIDAD (%)	Proporción de verdaderos positivos (PVP) = N_{11} / N_+	100%

La especificidad fue verificada con la proporción de verdaderos negativos (PVN) mediante la prueba binomial con un valor del 100%, teniendo una p-value de 1.000. La proporción de falsos positivos fue de 0%.

La Tabla 14 expresa el porcentaje de verdaderos negativos obtenido.

Tabla 14. Proporción de Verdaderos Negativos

	Verdaderos negativos (N_{22})	21
	Negativos esperados (N_-)	21
ESPECIFICIDAD (%)	Proporción de verdaderos negativos (PVN) = N_{22} / N_-	100%

La exactitud relativa fue verificada con la proporción de resultados concordantes a los esperados mediante la prueba binomial con un valor del 100%, teniendo una p-value de 1.000.

La Tabla 15 expresa el porcentaje de exactitud relativa.

Tabla 15. Porcentaje de Exactitud relativa.

	Resultados concordantes a los valores esperados ($N_{11} + N_{22}$)	42
	Total de ensayos (N)	42
EXACTITUD (%)	Exactitud relativa (ER) = $(N_{11} + N_{22}) / N$	100%

4.3 Determinación del Límite de Detección

El límite de detección es la mínima concentración donde se alcanza al menos el 95% de verdaderos positivos. Se determinó el límite de detección por adición de concentraciones conocidas de *Salmonella*, evaluando el porcentaje de verdaderos positivos.

El límite de detección fue de 10 UFC/25 g con una concentración de verdaderos positivos del 100%, la mínima concentración de 1 UFC/ 25 g alcanzó 83.33% de verdaderos positivos.

En la Tabla 16 se expresan los resultados obtenidos con una inoculación de 50 UFC/mL, con un resultado de 100% de verdaderos positivos.

Tabla 16. Concentración Teórica de 50 UFC/mL

N	Concentración Teórica (UFC)	Resultado	% Verdaderos positivos
1	50	Presencia	100.00
2	50	Presencia	
3	50	Presencia	
4	50	Presencia	
5	50	Presencia	
6	50	Presencia	

En la Tabla 17 se expresan los resultados obtenidos con una inoculación de 25 UFC/mL, con un resultado de 100% de verdaderos positivos.

Tabla 17. Concentración Teórica de 25 UFC/mL

N	Concentración Teórica (UFC)	Resultado	% Verdaderos positivos
1	25	Presencia	
2	25	Presencia	
3	25	Presencia	

4	25	Presencia	100.00
5	25	Presencia	
6	25	Presencia	

En la Tabla 18 se expresan los resultados obtenidos con una inoculación de 10 UFC/mL, con un resultado de 100% de verdaderos positivos.

Tabla 18. Concentración Teórica de 10 UFC/mL

N	Concentración Teórica (UFC)	Resultado	% Verdaderos positivos
1	10	Presencia	100.00
2	10	Presencia	
3	10	Presencia	
4	10	Presencia	
5	10	Presencia	
6	10	Presencia	

En la Tabla 19 se expresan los resultados obtenidos con una inoculación de 1 UFC/mL, con un resultado de 83.33 % de verdaderos positivos.

Tabla 19. Concentración Teórica de 1 UFC/mL

N	Concentración Teórica (UFC)	Resultado	% Verdaderos positivos
1	1	Presencia	83.33
2	1	Presencia	
3	1	Presencia	
4	1	Ausencia	
5	1	Presencia	
6	1	Presencia	

5. DISCUSIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen unos de los grandes problemas en la salud pública mundial. El género *Salmonella* spp. es uno de los más importantes por el gran número de casos y brotes. En los últimos años en el Perú, se han reportado 35 brotes de ETA de los cuales el 47 % están relacionados clínicamente de Salmonelosis. **(Ministerio de Salud, 2012)**. La presencia del género *Salmonella* en materias primas utilizadas en acuicultura y productos hidrobiológicos distribuidos en Perú, Estados Unidos y la Unión Europea, está condicionada a una contaminación primaria, o cruzada por la manipulación, almacenamientos y distribución de estos alimentos.

Los requisitos sanitarios para la exportación de productos hidrobiológicos con el paso de los años son cada vez más exigentes, así que los países exportadores deben demostrar que sus productos son inocuos y de calidad, en el caso de *Salmonella* spp. su resultado debe de ser Ausencia/25g, demostrando la total inocuidad de este patógeno. Muchos métodos de ensayo para la detección de *Salmonella* spp. existen a nivel mundial, pero el más aceptado es el de la ISO 6579:2002.

La norma **ISO 16140-2:2016**, expresa que el proceso de validación de métodos de laboratorio permite a los laboratorios de ensayo inocular muestras para poder observar las características del microorganismo en los diferentes métodos de ensayo, para la detección de patógenos el laboratorio emplea una concentración de 10 – 100 UFC/mL del microorganismo objetivo y también del uso de un microorganismo no objetivo con una concentración >1000 UFC/mL; en el caso de *Salmonella* spp. se usa un cultivo mixto de las tres especies más conocidas: *Salmonella enterica* (ML-01), *Salmonella typhi* (ML-09), *Salmonella paratyphi* (ML-21). La concentración obtenidas experimentalmente fueron de 77×10^7 UFC/mL para la cepa de *Salmonella enterica* (ML-01), de 89×10^6 UFC/mL para la cepa de *Salmonella typhi* (ML-

09), y de 38×10^6 para la cepa de *Salmonella paratyphi* (ML-21) y el microorganismo no objetivo empleado fue *Escherichia coli* con una concentración de 70×10^7 .

Las muestras que fueron inoculadas con cepas de *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y *Escherichia coli*, dieron como resultado Presencia/25g para *Salmonella* spp., y las 21 de las muestras no inoculadas para la matriz dieron como resultado Ausencia/25g. Se determinó que el método es sensible, específico y exacto mediante una prueba estadística binomial, con una proporción de falsos negativos y falsos positivos de 0%. **Camaró et al., 2013**, expresa que la sensibilidad de un método de ensayo debe ser del 100 % y que esta proporción de muestras que contienen el microorganismo investigado responde positivamente al método. Además define que la especificidad es la capacidad de un ensayo de detectar sólo el objetivo pretendido y que la cuantificación del microorganismo objetivo no se debe ver afectada por reactividad cruzada de otro microorganismo no objetivo relacionado o potencialmente interferente.

Es importante decir, que el método demostró ser capaz de detectar una contaminación menor de 10 UFC por porción analizada, con una concentración de verdaderos positivos del 100%, en el caso de la mínima concentración de 1 UFC/ 25 g empleada en el ensayo no pudo ser determinada como la mínima concentración, debido a que solo alcanzó un 83.33% de verdaderos positivos, no cumpliendo con lo establecido de 95% de verdadero positivos. **Camaró et al., 2013** expresa que el límite de detección de un microorganismo se aplica generalmente a métodos cualitativos. Su estimación deberá realizarse sobre muestras naturales con carga baja del microorganismo a estudiar o, en su defecto, con muestras inoculadas preferiblemente no esterilizadas para que exista microbiota interferente; en el caso de este estudio se empleó muestras inoculadas tanto con el microorganismo objetivo y el no objetivo.

6. CONCLUSIONES

- El método fue implementado adecuadamente para la matriz de premezcla acuícola.
- En las muestras inoculadas se detectó el microorganismo objetivo, identificando las colonias típicas en los agares selectivos, realizando las pruebas bioquímicas y serológicas; y en las matrices no inoculadas, no detectaron el microorganismo objetivo.
- La proporción de verdaderos positivos es 100% y la proporción de verdaderos negativos es 100%. En consecuencia, la precisión se cumple debido a que la proporción de falsos positivos y la proporción de falsos negativos, en ambos casos, es 0%.
- El método es Preciso porque logra 0% de falsos positivos y 0% de falsos negativos.
- El método es sensible al 95% de confianza debido a que su p-value en la prueba binomial fue de 1.000 y este valor es mayor que el nivel de significancia del 0.05.
- El método es específico al 95% de confianza debido a que su p-value en la prueba binomial fue de 1.000 y este valor es mayor que el nivel de significancia del 0.05.
- El método es exacto debido a que demuestra un alto grado de concordancia con los resultados esperados; además de ser preciso porque los resultados esperados para las muestras inoculadas coinciden entre sí, en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, y lo mismo ocurre con los resultados esperados de las muestras no inoculadas.

- El método es exacto al 95% de confianza debido a que su p-value en la prueba binomial fue de 1.000 y este valor es mayor que el nivel de significancia del 0.05.
- El método es veraz porque es 100% exacto.
- El límite de detección estimado para la matriz de pre-mezcla acuícola fue de 10 UFC/25 g con un 100% de verdaderos positivos.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la estimación de microorganismos mediante el método de recuento en placa, para la obtención de un valor numérico aproximado de microorganismos a inocular.
- Se recomienda el uso de sueros individuales serológicos, si se desea una tipificación más exacta de los géneros de *Salmonella* spp.
- Aunque los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron satisfactorios, se recomienda utilizar inóculos entre 10 - 1 UFC/mL para la estimación más precisa del límite de detección del método.
- Se recomienda revisar las normas periódicamente para verificar posibles cambios con el tiempo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAFCO (Association of American Feed Control Officials). 2000. Official Publication, Association of American Feed Control Inc. West Lafayette, IN 47971 USA, 444p. Recuperado de: <http://www.aafco.org>
2. Ahmed, F.E. (Ed.), 1991. *Seafood Safety*. National Academy Press, Washington D.C., USA.
3. Andreoletti, O., Budka, H., Buncic, S., Colin, P., Collins, J. D., De, A., & Vanopdenbosch, E. 2008. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *The EFSA J*, 720, 1-84.
4. Andrews, W.; Jacobson, A.; Hammack, T. 2014. *Salmonella* In: Bacteriological Analytical Manual. Versión Febrero 2014. Food and Drug Administration (FDA). Washington, D.C., EEUU.
5. Bäumlér, A. 1997. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends in Microbiol.*, 5:8.
6. Camaró M., Catalá V., Gimeno C., Martínez R., & P. Olmos. 2013. Validación y Verificación Analítica de los Métodos Microbiológicos, Procedimientos en Microbiología Clínica. EIMC. ISBN-13: 978-84-616-6564-8; Pág. 1-17.
7. Cortés, A; Janeth, A; Sandino, C. 2002. Validación de la prueba de esterilidad para vacunas preparadas en vehiculo oleoso y acuoso. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogota, Colombia, 93 Págs.

8. Creus, E., Baucells, F., Perez, J. F., and Mateu, E. 2004. *Salmonella* contamination in swine feeds and feed ingredients. Proc.18th International Pig Veterinary Society Congress, p 676, Hamburg (Germany).
9. Del Rosario M. y Vicente C., 2000. Microbiología alimentaria metodología analítica para alimento, Díaz de Santos, S. A. Juan Bravo, Madrid, España; ISBN: 9788479784249. p. 41-62.
10. Department of Veterinary Disease Biology, 2011. Faculty of health and medical sciences. University of Copenhagen [en línea]. [Consulta: 08 enero 2018]. Disponible en: http://atlas.sund.ku.dk/microatlas/veterinary/plating_media/XLD/
11. EA Guide EA-04/10: 2002. Accreditation for Laboratories Performing Microbiological Testing.
12. ENAC, 2202. Guia para la acreditación de laboratorios que realizan Analisis Microbiologivos. G-ENAC-04. 17 págs.
13. 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 págs.
14. Ewing WH. Identification of Enterobacteriaceae. 1986. 4th. ed. Elsevier. 200-208 págs.
15. Ewing, W.H. and Ball, M.M., 1996. The biochemical reaction of the genus *Samonella*. National Center of Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.

16. FAO e IFIF. 2014. Buenas prácticas para la industria de piensos – Implementación del Código de Prácticas Sobre Buena Alimentación Animal. Manual FAO de producción y sanidad animal. No 9. Roma
17. FAO 2002, Inocuidad y comercio de la harina de pescado; Octava reunión Bremen, Alemania, 12-16 de febrero.
18. FAO. 2002. Manual de Capacitación - Certificación de Calidad de los Alimentos Orientada a Sellos de Atributos de Valor en Países de América Latina.
19. Figueroa, M. 1984. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centroamérica. EUNED.
20. Gómez Lus R., 1980. Género *Salmonella*. En: Matilla V, Pumarola A, Gómez Lus R, Del Rey Calero J, Rodríguez Torres A, García Rodríguez JA, Piedrola Angulo G y Mira Gutiérrez J, editores. Microbiología y Parasitología. Madrid: Amaro Ediciones, 1980:305-14.
21. Le Minor, L., 1984. *Salmonella*. En: Krieg NR y Holt JG, editores. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. London: Williams y Wilkins, 1984;I: 427-58.
22. Maloy, S.; Stewart, V. and Taylor, R., 1996. Genetics of bacterial pathogens. ColdSpring Harbor Laboratory Press NY.
23. Millemann, Y. 1998. Le pouvoir pathogène des salmonelles: facteurs de virulence et modèles d'étude. Vet. Res. 29, 385-407.
24. Ministerio de Salud, 2012. Enfermedades Transmitidas por Alimentos, una importante causa de morbilidad en nuestro País, Boletín Epidemiológico Nro. 50. Vol. 21, Dirección General de Epidemiología,

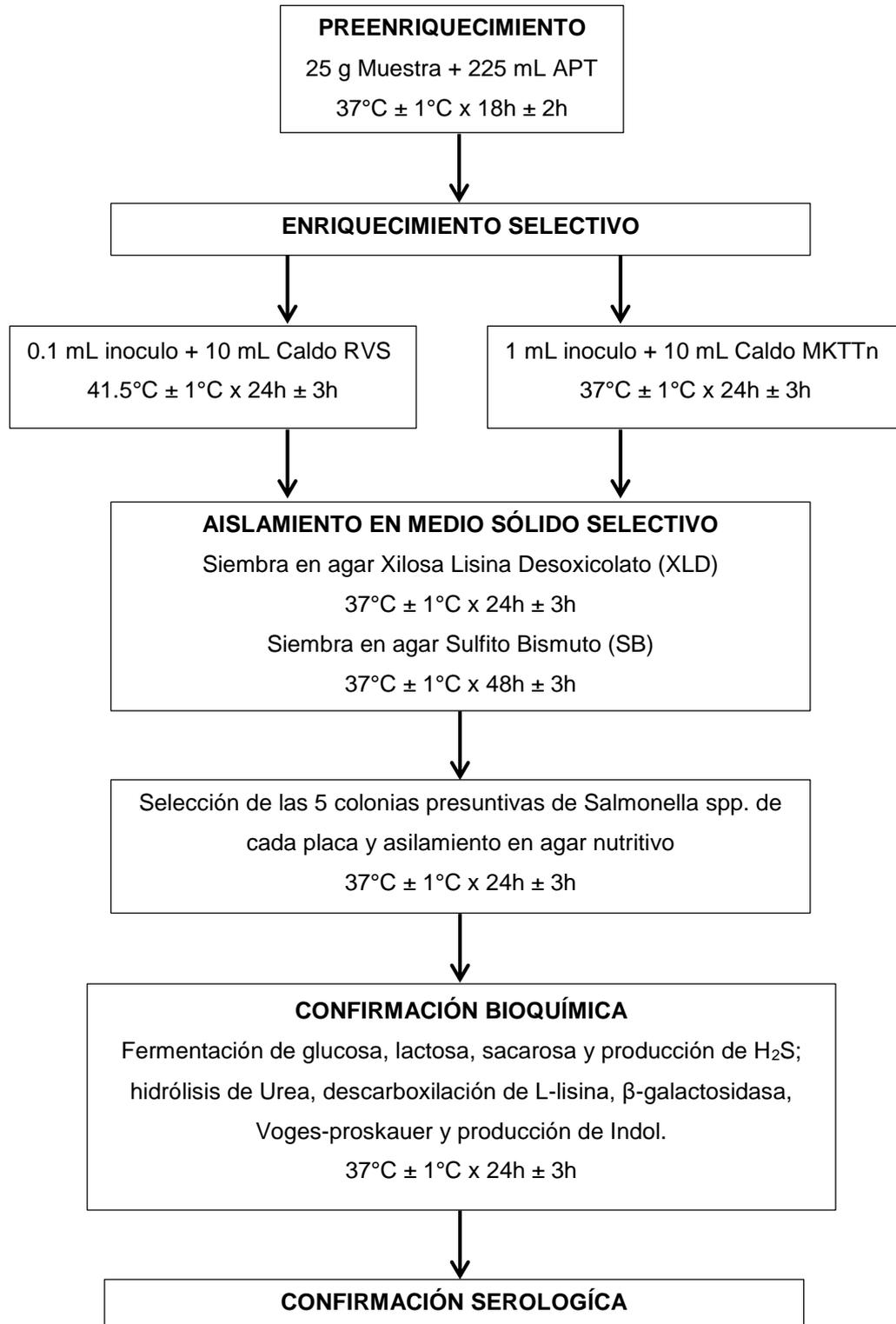
Red Nacional de Epidemiología. ISSN versión electrónica: 1816-8655.
Pg. 834 – 835. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/boletin.php>

25. Norma ISO 6579:2002. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 25 Págs.
26. Norma ISO 9000 vigente. Sistemas de Gestión de la Calidad - Fundamentos y vocabulario.
27. Norma ISO/TR 13843 vigente. Water quality - Guidance on validation of microbiological methods.
28. Norma ISO 16140-2: 2016. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods.
29. OIE. 2008. Salmonellosis. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Capítulo 2.9.9.
30. Organización Mundial de la Salud. OMS. 2013. Salmonellosis: Nota descriptiva N°139 Agosto de 2013 Food Safety Department OMS/Ginebra.
31. Odumeru J. y Leon-Velarde C., 2012. *Salmonella* Detection Methods for Food and Food ingredients, *Salmonella* – A dangerous Foodborne Pathogen. Editorial InTech. Capítulos 17, p. 373-392. ISBN: 978-953-307-782-6.
32. Palacios, M.P.; Lupiola P.; Del Nero E.; Pardo A.; Rodríguez F.; Pita M.L. y Tejedor M.T. 1999. Primeros resultados del estudio de la persistencia de *Salmonella* en la zona no saturada del suelo agrícola. Estudios de la Zona No Saturada del Suelo. Eds. R. Muñoz-Carpena, A. Ritter, C. Tascón. ICIA: Tenerife.

33. Popoff, M. and Le Minor, L. 1997. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 7ma revision, Instituto Pasteur, Paris – France. 151p.
34. Popoff, M.; Bockemühl, J.; Brenner, F.; Gheesling, L. 2001. Supplement 2000 (Nº 44) to the Kauffmann – White scheme. Res. Microbiol. 152: 2001, 907-9.
35. Reilly, P.J.A., D.R. Twiddy and R.S. Fuchs, 1992. *Review of the occurrence of Salmonella in cultured tropical shrimp*. FAO Circulares de Pesca Nº 851. FAO, Rome.
36. Rick, P. D., 1987. Lipopolysaccharide biosynthesis. En *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology, F. C. Neidhardt (Ed.). Washington, DC: ASM Publications.; p. 648-662.
37. Stickney, R.R. 2000. History of aquaculture, pp.436-446. In: Stickney, R.R. (Editor), *Encyclopedia of Aquaculture*, John Wiley y Sons Inc., New York, 1063p.
38. Zapatero E., 1974. *Microbiología médica*. Séptima edición. Valladolid: Sever cuesta, 1974:257-66.

9. ANEXOS

Anexo 01: Método para detección de *Salmonella* spp. según norma ISO 6579:2002



Anexo 02: Composición y preparación de medios de cultivo y reactivos

2.1 Agua Peptona Tamponada

2.1.1 Composición

Digestión enzimática de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Disodio fosfato de hidrogeno dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9.0 g
Fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4)	1.5 g
Agua	1000 mL

2.1.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua, por calentamiento si fuera necesario. Ajustar el pH de modo que la esterilización sea 7.0 ± 0.2 a 25°C . Dispensar el medio en frascos de capacidad adecuada para obtener las porciones necesarias para el ensayo. Esterilizar durante 15 minutos en la autoclave a 121°C .

2.2 Medio Rappaport-vassiliadis con soya (caldo RVS)

2.2.1 Solución A

2.2.1.1 Composición

Digestión enzimática de caseína	5.0 g
Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4)	1.4 g
Fosfato hidrógeno dipotásico (K_2HPO_4)	0.2 g
Agua	1000 mL

2.2.1.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua por calentamiento a casi 70°C . La solución se debe preparar en el día de la preparación del medio RVS completo.

2.2.2 Solución B

2.2.2.1 Composición

Cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	400.0 g
Agua	1000 m L

2.2.2.2 Preparación

Disolver el cloruro de magnesio en el agua. La solución se puede mantener en un frasco de vidrio oscuro con tapa hermética temperatura ambiente durante al menos 2 años.

2.2.3 Solución C

2.2.3.1 Composición

Oxalato de verde de malaquita	0.4 g
Agua	100 m L

2.2.3.2 Preparación

Disolver el Oxalato de verde de malaquita en el agua. La solución se puede mantener en un frasco de vidrio oscuro con tapa hermética temperatura ambiente durante al menos 8 meses.

2.2.4 Medio Completo

2.2.4.1 Composición

Solución A	1000 mL
Solución B	100 mL
Solución C	10 mL

2.2.4.2 Preparación

Adicionar a 1000 mL de solución A, 100 mL de solución B y 10 mL de solución C. Ajustar el pH de modo que después de la esterilización sea 5.2 ± 0.2 . Antes de usar, dispensar en tubos de ensayo cantidades de 10 mL. Esterilizar durante 15 minutos en la autoclave a 115°C .

2.3 Caldo de Tetrionato-novobiocina de Muller-Kauffmann (MKTTn)

2.3.1 Medio Base

2.3.1.1 Composición

Extracto de carne	4.3 g
Muestra digestada enzimática de caseína	8.6 g
Cloruro de sodio (NaCl)	2.6 g
Carbonato de calcio (CaCO ₃)	38.7 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado (Na ₂ S ₂ O ₃ *5H ₂ O)	47.8 g
Bilis de buey para uso bacteriológico	4.78 g
Verde brillante	9.6 mg
Agua	1000 mL

2.3.1.2 Preparación

Disolver los componentes básicos deshidratados o el medio completo deshidratado en el agua mediante ebullición durante 5 minutos. Ajustar el pH de modo que sea 8.0 ± 0.2 a 25°C.

2.3.2 Solución Yodo-yoduro

2.3.2.1 Composición

Yodo	20.0 g
Yoduro de potasio (KI)	25.0 g
Agua	100 mL

2.3.2.2 Preparación

Disolver por completo el yoduro de potasio en 10 mL de agua, luego adicionar el yodo y diluir a 100 mL con agua esterilizada. No calentar.

2.3.3 Solución de novobiocina

2.3.3.1 Composición

Sal sódica novobiocina	0.04 g
Agua	5 mL

2.3.3.2 Preparación

Disolver la sal sódica novobiocina y esterilizar por filtración.

2.3.4 Medio Completo

2.3.4.1 Composición

Medio Base	1000 mL
Solución de Yodo-yoduro	20 mL
Solución de novobiocina	5 mL

2.3.4.2 Preparación

Asépticamente, adicionar 5 mL de solución de novobiocina a 1000 mL de medio base. Mezclar, luego adicionar 20 mL de solución yodo-yoduro, mezcla bien. Dispensar el medio asépticamente en frascos estériles de capacidad adecuada para obtener las porciones necesarias para la prueba.

2.4 Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (agar XLD)

2.4.1. Composición

Polvo de extracto de levadura	3.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Xilosa	3.75 g
Lactosa	7.5 g
Sacarosa	7.5 g
Clorhidrato de L-lisina	5.0 g
Tiosulfato de sodio	6.8 g
Citrato de amonio de hierro (III)	0.8 g
Rojo de fenol	0.08 g
Desoxicolato de sodio	1.0 g
Agar	9 g a 18 g
Agua	1000 mL

2.4.2 Preparación

Disolver los componentes de base deshidratados o la base completa deshidratada en el agua a calentar, con agitación frecuente, hasta que el medio empiece a hervir. Evitar el sobrecalentamiento. Ajustar el pH de modo

que la esterilización sea 7.4 ± 0.2 a 25° . Calentar con agitación frecuente hasta que el medio hierva y el agar se disuelva. No sobrecalentar.

Transferir de inmediato a un baño de agua a 44°C a 47°C , agitar y verter en placas. Dejar solidificar.

Inmediatamente antes de usar, secar las placas de agar cuidadosamente en la estufa entre 37°C y 55°C hasta que la superficie de agar esté seca.

2.5 Agar Sulfito Bismuto (Agar SB)

2.5.1 Composición

Digestión enzimática de tejido animal	10.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Dextrosa	5.0 g
Disodio fosfato de hidrogeno (Na_2HPO_4)	4.0 g
Sulfato ferroso	0.3 g
Sulfito bismuto	8.0 g
Verde brillante	0.025 g
Agar	20.0 g
Agua	1000 mL

2.5.2 Preparación

Agregar los componentes en agua y calentar con agitación frecuente hasta ebullición. Continuar hirviendo suavemente por 30 s a 60 s para disolver el agar y obtener una suspensión uniforme (el precipitado no se disolverá). Enfriar a 47°C a 50°C , luego agitar suavemente para suspender el precipitado. Ajustar el pH a 7.7 ± 0.2 a 25°C .

Verter 20 mL a 25 mL en placas petri y dejar reposar. Preparar las placas un día antes de su uso y almacenar en la oscuridad a temperatura ambiente.

2.6 Agar Nutritivo

2.6.1 Composición

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g

Agar	9 g a 18 g
Agua	1000 mL

2.6.2 Preparación

Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en el agua, por calentamiento si fuera necesario. Ajustar el pH de modo que después de la esterilización sea de 7.0 ± 0.2 a 25°C . Transferir el medio de cultivo a frascos de capacidad apropiada. Esterilizar durante 15 minutos en la autoclave a 121°C .

Transferir casi 15 mL del medio derretido a unas placas de Petri pequeñas esterilizadas.

2.7 Agar Triple Azúcar Hierro (Agar TSI)

2.7.1 Composición

Extracto de carne	3.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	20.0 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Glucosa	1.0 g
Citrato de Hierro (III)	0.3 g
Tiosulfato de sodio	0.3 g
Rojo de fenol	0.024 g
Agar	9 g a 18 g
Agua	1000 mL

2.7.2 Preparación

Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en el agua, calentando si fuera necesario. Ajustar el pH de manera que después de la esterilización sea 7.4 ± 0.2 a 25°C . Esterilizar durante 15 minutos en autoclave a 121°C .

Dejar reposar en posición inclinada de manera que se obtenga un parte profunda de unos 2.5 cm a 5 cm.

2.8 Agar Urea (Christensen)

2.8.1 Medio Base

2.8.1.1 Composición

Peptona	1.0 g
Glucosa	1.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Dihidrógeno fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	2.0 g
Rojo fenol	0.012 g
Agar	9 g a 18 g
Agua	1000 mL

2.8.1.2 Preparación

Disolver los componentes de la base completa deshidratada en el agua, por calentamiento si fuera necesario. Ajustar el pH de modo que después de la esterilización sea $6.8 \pm 0,2$ a 25°C. Esterilizar durante 15 minutos en autoclave a 121°C.

2.8.2 Solución de Urea

2.8.2.1 Composición

Urea	400 g
Agua, a volumen final de	1000 mL

2.8.2.2 Preparación

Disolver la urea en el agua. Esterilizar por filtración.

2.8.3 Medio Completo

2.8.3.1 Composición

Base	950 mL
Solución de urea	50 mL

2.8.3.2 Preparación

Adicionar, bajo condiciones asépticas, la solución de urea a la base, previamente derretida y luego enfriada a 44°C a 47°C. Dispensar el medio

completo en tubos esterilizados en cantidades de 10 mL. Dejar asentar en una posición inclinada.

2.9 Medio de descarboxilación de L-Lisina

2.9.1 Composición

Monohidrocloreto de L-Lisina	5.0 g
Extracto de yeso	3.0 g
Glucosa	1.0 g
Purpura de bromocresol	0.015 g
Agua	1000 mL

2.9.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua, Por calentamiento si fuera necesario. Ajustar el pH de modo que después de la esterilización sea 6.8 ± 0.2 a 25°C . Transferir el medio en cantidades de 2 mL a 5 mL A tubos de cultivo estrechos con tapa rosca. Esterilizar durante 15 minutos en autoclave a 121°C .

2.10 Reactivos para reacción Voges-Proskauer (VP)

2.10.1 Medio VP

2.10.1.1 Composición

Peptona	7.0 g
Glucosa	5.0 g
Fosfato hidrógeno dipotásico (K_2HPO_4)	5.0 g
Agua	1000 mL

2.10.1.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua, Por calentamiento si fuera necesario. Ajustar el pH de modo que después de la esterilización sea 6.9 ± 0.2 a 25°C . Transferir el medio a los tubos en cantidades de 3 mL. Esterilizar durante 15 minutos en autoclave a 121°C .

2.10.2 Solución de creatina (N-amidinosarcosina)

2.10.2.1 Composición

Monohidrato de creatina	0.5 g
Agua	100 mL

2.10.2.2 Preparación

Disolver el monohidrato de creatina en agua.

2.10.3 1-Naftol, solución etanólica

2.10.3.1 Composición

1-naftol	5 g
Etanol, 96% (Fracción de volumen)	100 mL

2.10.3.2 Preparación

Disolver el 1-naftol en el etanol.

2.10.4 Solución de hidróxido de potasio

2.10.4.1 Composición

Hidróxido de potasio	40 g
Agua	100 mL

2.10.4.2 Preparación

Disolver el hidróxido de potasio en agua.

2.11 Reactivos para reacción Indol

2.11.1 Medio Triptona/Triptofano

2.11.1.1 Composición

Triptona	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
DL-Triptofano	1 g
Agua	1000 mL

2.11.1.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua hirviendo. Ajustar el pH de modo que después de la esterilización sea 7.5 ± 0.2 a 25°C . Dispensar 5 mL de medio en cada uno de los tubos. Esterilizar durante 15 minutos en autoclave a 121°C .

2.11.2 Reactivo Kovacs

2.11.2.1 Composición

4-dimetilaminobenzaldehido	5 g
Ácido Clorhídrico, $\rho=1.18 \text{ g/mL}$ a 1.19 g/mL	25 mL
2-metilbutano-2-ol	75 mL

2.11.2.2 Preparación

Mezclar los componentes

2.12 Agar Nutritivo Semi-sólido

2.12.1 Componentes

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	4 a 9 g
Agua	1000 mL

2.12.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua, calentar si fuera necesario. Ajustar el pH de modo que después de la esterilización sea 7.0 ± 0.2 a 25°C . Transferir el medio a frascos de capacidad apropiada. Esterilizar durante 15 minutos en autoclave a 121°C .

Verter en las placas de Petri esterilizadas, caso 15 mL del medio recién preparado. No dejar que las placas de agar se sequen.

2.13 Solución Salina Fisiológica

2.13.1 Composición

Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua	1000 mL

2.13.2 Preparación

Disolver el cloruro de sodio en el agua. Ajustar el pH de modo que después de la esterilización sea 7.0 ± 0.2 a 25°C . Esterilizar durante 15 minutos en autoclave a 121°C .