



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**MÉTODO AUTOMATIZADO VIDAS PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA SP.
PROVENIENTE DE ALIMENTOS EN UN LABORATORIO DE ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICO (CALLAO)**

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Trabajo de Suficiencia Profesional para optar el título profesional de Licenciada en
Biología

Autora:

Espinal Vascones, Tessy Antonia

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Jurado:

Rodrigo Rojas, Maria Elena
Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel
Saez Flores, Gloria María

Lima - Perú

2023





**Universidad Nacional
Federico Villarreal**

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**MÉTODO AUTOMATIZADO VIDAS PARA LA DETECCIÓN DE *SALMONELLA* SP.
PROVENIENTE DE ALIMENTOS EN UN LABORATORIO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO
(CALLAO)**

Línea de Investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología.

Trabajo Académico para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Autor(a):

Espinal Vascones, Tessy Antonia

Asesor(a):

Salas Asencios, Ramsés

(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Jurado:

Rodrigo Rojas, Maria Elena

Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel

Saez Flores, Gloria María

Lima – Perú

2023

Dedicatoria

Agradezco a mi familia por ser mi apoyo incondicional, especialmente a mi madre, por creer en mí siempre, acompañando amorosa e incansablemente cada uno de mis pasos; a mi esposo, por ser mi soporte a lo largo de los años, mi fortaleza en momentos de dificultad; y a mi preciosa hija, que con su amor infinito me impulsa a superarme día a día.

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
I) INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Trayectoria del autor	7
1.2 Descripción de la empresa	9
1.3 Organigrama de la empresa.....	10
1.4 Áreas y funciones desempeñadas.....	11
II) DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA.....	15
2.1 Fundamento del método Ensayo fluorescente Ligado a Enzimas (ELFA).....	15
2.2 Método de Inmunoensayo Enzimático Automatizado VIDAS, (Vitek Immunodiagnostic Assay System)	19
2.3 Materiales.....	19
2.3.1 Procedimiento.....	22
2.3.2 Interpretación de Resultados.....	25
III) APORTES MÁS DESTACABLES A LA EMPRESA	27
IV) CONCLUSIONES.....	28
V) RECOMENDACIONES	29
VI) REFERENCIAS.....	30
VII) ANEXOS.....	33

RESUMEN

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA's) representan un problema en la salud pública a escala mundial. La bacteria *Salmonella* sp. desencadena una enfermedad de transmisión alimentaria que toma gran relevancia debido a que el cuadro de salmonelosis desarrolla síntomas variados desencadenando casos de mortalidad. En la industria de alimentos, se requieren que los métodos de detección de microorganismos sean automatizados y rápidos para abordar gran cantidad de muestras sin afectar su fiabilidad; para ello, en el laboratorio de Microbiología de S.G.S se utiliza un método automatizado para la detección de *Salmonella* sp. llamada VIDAS (Vitek Immunodiagnostic Assay System), un método de inmunoensayo enzimático que se basa en la especificidad y afinidad de un anticuerpo monoclonal, detectando secuencial y automáticamente a *Salmonella* sp. Siguiendo el método VIDAS, se procesan diariamente lotes de muestras de harina de pescado (y otros alimentos), obteniendo resultados en al menos diecinueve horas, ahorrando tiempo y costo, siendo, esto una de las ventajas más resaltantes frente a otros métodos de detección de *Salmonella* sp., además de la disminución del riesgo de contaminación, ya que la naturaleza de la técnica no requiere de mayor manipulación y se encuentra validado por Organizaciones internacionales como ISO y AOAC.

Palabras claves: método VIDAS, inmunoensayo, automatizado, *Salmonella* sp.

ABSTRACT

Foodborne diseases (FBI) represent a global public health challenge. The bacterium *Salmonella* sp. trigger a foodborne illness that takes great relevance since a case of salmonellosis develops varied symptoms up to cases of death. In the food industry, the detection methods of microorganisms must be automated and fast to deal with a large number of samples without affecting their reliability; for this purpose, the S.G.S. Microbiology laboratory uses an automated technique for the detection of *Salmonella* sp., called VIDAS (Vitek Immunodiagnostic Assay System), an enzymatic immunoassay method based on monoclonal antibody's specificity and affinity, detecting *Salmonella* sp. Sequentially and automatically. Following the VIDAS method, batches of fishmeal (and other food) samples are processed daily, obtaining results in at least nineteen hours, thus saving time and cost, being of the most imposing advantages over other methods of *Salmonella* sp's detection and also reduces the risk of contamination, since the nature of the technique does not require further handling and is validated by international organizations such as ISO and AOAC.

Keywords: VIDAS method, immunoassay, automated, *Salmonella* sp.

I) INTRODUCCIÓN

Las infecciones por la bacteria *Salmonella* sp., poseen especial relevancia por ser el agente de intoxicación alimentaria más importante puesto que implican efectos incapacitantes y altos costos al sistema de salud (Alfaro, 2013). Es una enfermedad de transmisión alimentaria (ETA) por alimentos y agua contaminados con microorganismos y se estima que una de cada diez personas se enferma por ingerir alimentos contaminados con alguna clase de parásito o bacteria (Burgos & Alberti, 2019).

La vigilancia en el control de la cadena de alimentos que se comercializan se ha convertido en una de las respuestas más eficaces que se realiza frente a la lucha de la salmonelosis. Los métodos de detección de *Salmonella* sp., deben tener un balance entre el costo y tiempo de la prueba, por lo que una detección oportuna permite tomar decisiones que logren poner a salvo a la población en riesgo.

Viendo esta necesidad, se creó el método VIDAS (Vitek Immunodiagnostic Assay System), que detecta secuencial y automáticamente a *Salmonella*, un método automatizado, altamente específico y rápido, puesto que se pueden obtener resultados en diecinueve horas, siendo una de sus principales ventajas, por lo cual, en el Laboratorio de Microbiología en temporada de alta demanda, especialmente de harina de pescado, el tiempo es un factor determinante.

El siguiente informe tiene como finalidad dar a conocer la tecnología que aplica este innovador método alternativo para la detección de *Salmonella* sp, explicando el paso a paso automatizado que realiza el equipo VIDAS destacando las ventajas imponentes del mismo.

1.1 Trayectoria del autor

Tessy Antonia Espinal Vascones, egresó de la Escuela Profesional de Biología a los 24 años; en el 2015 realizó sus prácticas preprofesionales en el Centro de Fauna Silvestre “Taricaya” en Puerto Maldonado, publicando sus resultados en el III Simposio de Primatología en el Perú en Puerto Maldonado, en la modalidad de presentación oral (poster). Asimismo, también expuso otros de sus trabajos de investigación en el “I Macroevento de las Redes de Investigación FCCNM – UNFV”. Ese mismo año llevó a cabo el curso de “Ecología numérica y estadística aplicada a la biología de la conservación”, realizado en el Colegio Regional del Callao para complementar el análisis de los resultados de sus trabajos de investigación. Finalmente culminó su preparación de inglés Intermedio 5 satisfactoriamente (Asociación cultural Peruano Británico – BRITÁNICO).

En el 2016 realizó sus prácticas profesionales en el área de Bienestar Animal en el Patronato del Parque de las Leyendas. A mediados del 2016, fue becada para realizar un viaje hacia Amazonas, y realizar monitoreos del primate endémico de Amazonas “Mono choro de cola amarilla” (*Lagothrix flavicauda*) en vida libre, además de realizar charlas en paralelo para colegios donde se intentaba concientizar a la población sobre la importancia de esta especie en peligro de extinción. Los resultados preliminares de su investigación fueron expuestos en el “III Curso Internacional: Métodos de Investigación y conservación de Primates Neotropicales en la Jungla de los Monos” en San Martín.

En el 2017 se reintegró al Patronato del Parque de las Leyendas como responsable de los cuidados de los especímenes que se encontraban en las Zonas de Cuarentena, Internacional, Sierra, Costa y Selva. Al mismo tiempo, se inscribió en la Escuela de Manejo de animales silvestres ex situ que se realizó en su mismo centro de trabajo, culminando satisfactoriamente.

En el 2018 formó parte de una ONG en Loreto - “Equipo primatológico del Perú (EPP)” que buscaba reincentivar la investigación de especies de primates. Además, realizó un curso sobre Primates en la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana en Iquitos-Perú. Al regresar a Lima, se actualizó en conocimientos acerca de “SISTEMAS DE GESTIÓN: Calidad, seguridad, Salud ocupacional y Medio Ambiente (normas ISO 9001, ISO 45001, e ISO 14001)” realizado por la UNFV, siendo aprobada y concluyéndolo satisfactoriamente.

En el 2019 postuló a SGS del Perú, una empresa líder mundial en inspección, verificación, ensayos, y certificación; ingresando al laboratorio de Microbiología y poniendo en práctica los conocimientos que adquirió en su etapa universitaria. Meses después, fue premiada por el laboratorio y la oficina de Recursos Humanos por exceder las expectativas en su desempeño como colaboradora en el laboratorio.

En el 2020 realizó un curso de “Análisis Microbiológico en aguas, interpretación de resultados de acuerdo a la normativa sanitaria y ambiental” con la finalidad de aportar los nuevos conocimientos en el laboratorio donde laboraba. En los siguientes meses realizó otro curso de Especialización, esta vez en “Sistemas de Gestión de la Calidad e Inocuidad: Global Gap, Haccp, Iso 9001, Iso 22000, FSSC 22000, HARPC (Ley Fsma), Iso 31000, Norma Mundial BRC V.8, Código SQF, IFS Fraude alimentario y Defensa alimentaria y de sus programas Pre-requisitos” realizado por la universidad Agraria de la Molina donde obtuvo triple certificación, y concluyó aprobando todos los módulos satisfactoriamente.

En el 2021 ya había rotado por las diversas áreas del laboratorio de Microbiología, llegando así el Área de Lectura y Reporte de ensayos de alimentos, aguas, superficies vivas e inertes, y demás variedades de muestras, ingresando al sistema los resultados de las mismas, en

diversas oportunidades también fue encargada de turno. Tuvo la oportunidad de aprender sobre Gestión de Calidad en el Laboratorio, lo que aportó para superar las auditorías con éxito.

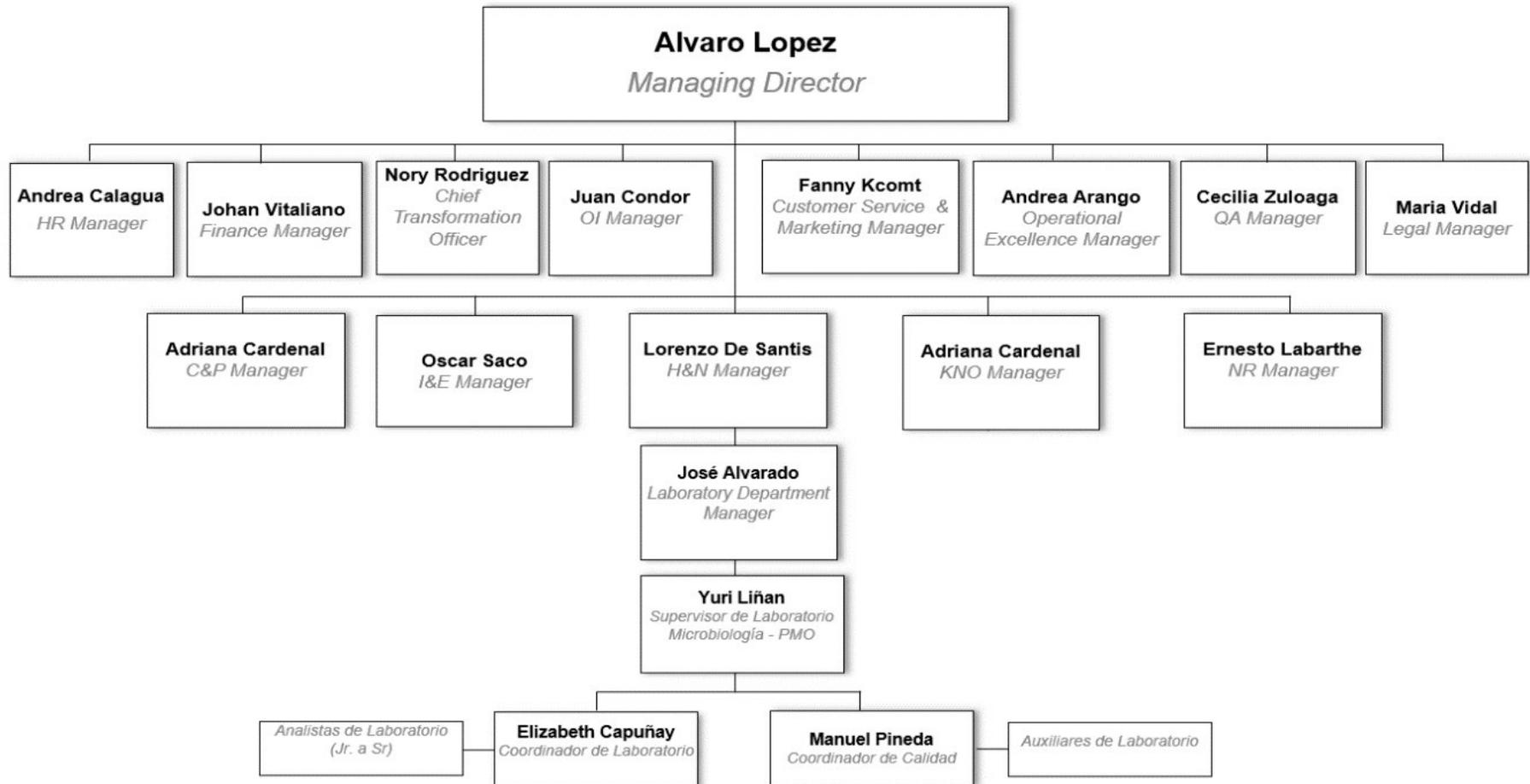
En el 2022, realizó el curso de “Criterios de Acreditación del Laboratorio Microbiológico acorde a la norma ISO 17025” aprobándolo con la nota máxima, además asistió al Webinar “Verificación y Monitoreo ambiental de Patógenos en la Producción de Alimentos” para aportar conocimientos actualizados al laboratorio, y en el mes de Julio del 2022 aprobó el “Curso de Actualización de Excel Profesional”.

1.2 Descripción de la empresa

SGS del Perú, es una empresa de origen Suizo que empezó a operar en el Perú en el año 1986, y en la actualidad ya cuenta con 28 sedes en las provincias del país, además de su expansión en otros países como Brasil, Argentina, Paraguay, Uruguay, Chile, Bolivia, Ecuador y Colombia, siendo líderes mundiales en servicios de inspección, verificación, análisis y certificación de productos y servicios, comprometidos con satisfacer las necesidades del Mercado Peruano en el sector industrial, agricultura, medioambiente, minería, pesca, productos de consumo, entre otros.

Sus Laboratorios y oficinas poseen certificaciones y acreditaciones tales como: ISO 9001, ISO 14001, OHSAS 18001, NTP-ISO/IEC 17020, NTP-ISO/IEC 17025, NTP-ISO/IEC 17065 así como también trabaja rigiéndose bajo la normativa nacional vigente.

1.3 Organigrama de la empresa



1.4 Áreas y funciones desempeñadas

Dos veces por semana, el analista realiza controles ambientales exponiendo los medios Agar Cuenta Colonias (PCA) y Agar de Mohos y Levaduras en las siguientes áreas: harina de pescado, sala de cámara de flujo laminar, sala de incubadoras (lectura de resultados de ensayos microbiológicos diversos y harina de pescado), sala de baño de agua y salas estériles de trabajo (sala de pasajes y sala de análisis) y sala de Microscopía durante 15 minutos. Luego son tapadas e incubadas a la temperatura correspondiente, PCA a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h y OGY de 22°C a 25°C por 5 días. Al leer las placas control, no deberían de sobrepasar el conteo de más de 15 UFC por placa, y si los sobrepasan, se evalúan los resultados obtenidos en los controles que se usaron para el análisis de los ensayos realizados en el día y si se encontrasen contaminados se procede a re-analizar las muestras.

Se debía realizar la limpieza del ambiente usando alcohol al 70% para desinfectar, sobre todo las mesas de análisis.

La Medición de la temperatura y humedad relativa: se realizaba con un termo higrómetro calibrado; registrando diariamente los resultados de la humedad relativa (rango referencial: 45 - 70 %) y temperatura (rango referencial: 20°C a 25°C) en los ambientes de trabajo y anotarlos en el formato de Control de Ambiente. Los ambientes controlados eran la Sala de Pasajes, Sala de análisis, Sala de Harina de Pescado, Cabina de Flujo Laminar, Sala de preparación de medios de cultivo, sala de baños, sala de incubadoras y reporte (diversos y harina de pescado) y Microscopía.

1.4.1 Área de Harina de Pescado

- Pesado: En esta área se realizaba el pesado de las muestras de interés, el peso dependía del análisis y protocolo requerido por el cliente.

- **Análisis:** En el área de análisis se vertía caldo de enriquecimiento en las muestras de interés, el tipo de caldo vertido era de acuerdo a lo que indica el protocolo de análisis de detección (ISO, APHA, ICMSF, FDA) en los microorganismos. En el área de Harina de Pescado se realizaba la enumeración de Enterobacterias, numeración de Aerobios mesófilos, numeración de Mohos y Levaduras, utilizando métodos rápidos. Usualmente se detectaban microorganismos como *Salmonella sp.*, *Vibrio cholerae*, *Shigella spp.*

Existen factores que tienen la posibilidad de perturbar los resultados de los ensayos microbiológicos y por tanto la fiabilidad de los mismos; por lo tanto, se considera tomarlos como controles durante el análisis de las muestras. Dichos factores son los siguientes: el control de ambiente durante el análisis, el control de esterilidad de diluyentes y del medio de cultivo (blanco, sin siembra de microorganismos), control del material de vidrio, control de blenders, controles positivos (con inoculación de cepas) por cada ensayo microbiológico realizado. Si por alguna razón no se realizan algunos de los controles mencionados, se repiten los ensayos microbiológicos.

1.4.2 Área de Pasajes de muestras:

En esta área realizaba las pruebas de confirmación o bioquímicas de los microorganismos analizados que resultaban presuntivos, además de los pasajes complementarios a los análisis (estriar en agares, realizar pruebas Elisa, inocular las muestras en caldos de enriquecimiento, y otros), para confirmar la presencia o ausencia de los microorganismos.

1.4.3 Área de Análisis de alimentos diversos

En esta área realizaba el pesado y análisis de las muestras de comidas, carnes, alimentos congelados, según requerimientos del cliente en las órdenes de ensayo, numeraciones de microorganismos o detecciones; las enumeraciones más frecuentes requeridas diariamente en las órdenes de ensayo eran de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, coliformes totales y fecales, enterobacterias, enterococos, mohos, levaduras, aerobios mesófilos, etc así como las detecciones de *Samonella sp.*, *Vibrio cholerae*, *Shiguela spp*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, y otros, que son los análisis más comunes. Al finalizar cada análisis, efectuaba los controles positivos (inoculando cepa) y negativos para cada ensayo microbiológico como menciono anteriormente.

Realizaba, además, análisis de aguas: potable, aguas superficiales, aguas residuales, y sus pruebas de confirmación si es que habría hallazgo de algún microorganismo. También analizaba muestras de superficies vivas e inertes, en ocasiones, los clientes enviaban la muestra para que en el laboratorio realicemos el muestreo de la misma.

Por último, realizaba microscopía a muestras de harinas de pescado con el fin de detectar componentes de origen animal (DPA) según sea requerimiento en la orden de ensayo.

1.4.4 Reporte de Harina de pescado y alimentos diversos

Después de concluidos los análisis en las muestras de interés, sus resultados son reportados al sistema CCLAS/SLIM, se debe de revisar que los esquemas a reportar tengan los controles y datos necesarios para introducirlos correctamente al sistema, emitiendo así el reporte de resultados a los coordinadores del laboratorio, y ellos se encargaban de realizar el informe al cliente.

Para los ensayos cualitativos se considera 0 como ausencia, 0.5 como presuntivo y 1 como presencia, y para los ensayos cuantitativos se colocaba el factor de dilución, el conteo de número de colonias por placa (según el esquema escogido) y cuando lo requiera las colonias seleccionadas y confirmadas, además de las pruebas bioquímicas realizadas.

II) DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

La empresa SGS está conformada por una gama de laboratorios, dentro de los cuales abarca un laboratorio de Microbiología destinado al Análisis de alimentos (comidas, congelados, etc), superficies (vivas, inertes), aguas (potables, superficiales, residuales, etc) y harina de pescado. Dentro de los diversos análisis que se realizan, el uso del equipo VIDAS para la detección de *Salmonella* sp. es uno de los más resaltantes y confiables en el proceso de identificación y detección para este microorganismo. VIDAS, fue incorporado hace algunos años siguiendo las instrucciones del fabricante, con el objetivo de reducir el tiempo de entrega de resultados e incrementar la sensibilidad de detección para *Salmonella* sp. A continuación, se detalla el fundamento y procedimiento para la detección de *Salmonella* sp. mediante el método ELFA (Ensayo fluorescente Ligado a Enzimas) usando la tecnología VIDAS.

2.1 Fundamento del método Ensayo fluorescente Ligado a Enzimas (ELFA)

El método ELFA fue descubierto en el año 1979 con la finalidad de detectar antígenos de rotavirus en muestras de heces proveniente de niños que obtuvieron un resultado negativo mediante el método ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Este estudio fue realizado para obtener un mayor porcentaje de sensibilidad en muestras presuntivas de rotavirus con una carga viral baja (Yolken & Stopa, 1979).

Actualmente este método es muy usado en el área clínica humana, animal y alimentaria, ya que permite detectar y cuantificar con mayor precisión varios tipos de antígenos, marcadores biológicos, hormonas, entre otros (Anderson et al., 2017; Dave et al., 1986; Martínez et al., 1999; Rohonczy et al., 2014).

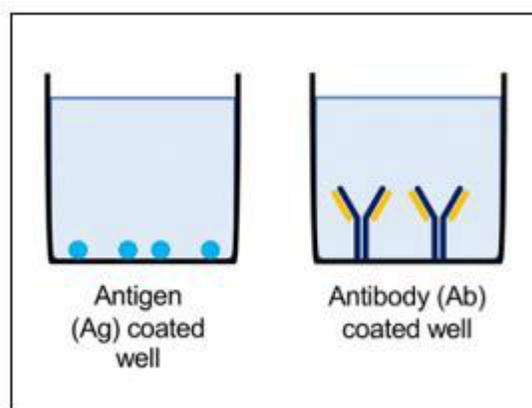
El método ELFA cuenta con el mismo principio basal del método ELISA, la diferencia es que el ELFA utiliza un sustrato fluorescente (4- metil-umbeliferil fosfato) el cual posee altos niveles de fluorescencia y estabilidad a los procesos de autooxidación (Dave et al., 1986). Al igual que el método de ELISA, el ELFA posee cuatro pasos principales: recubrimiento, lavado, detección y lectura final.

En principio esta técnica cuenta con una fase sólida el cual puede capturar al antígeno o al anticuerpo de interés. El soporte sólido normalmente es de poliestireno (placa distribuida con pocillos) de base recta con afinidad hacia las proteínas (Boguszewska et al., 2019; Yu et al., 2018).

Figura 1.

Presentación esquemática de la fase sólida (antígeno o anticuerpo).

<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03239-6>

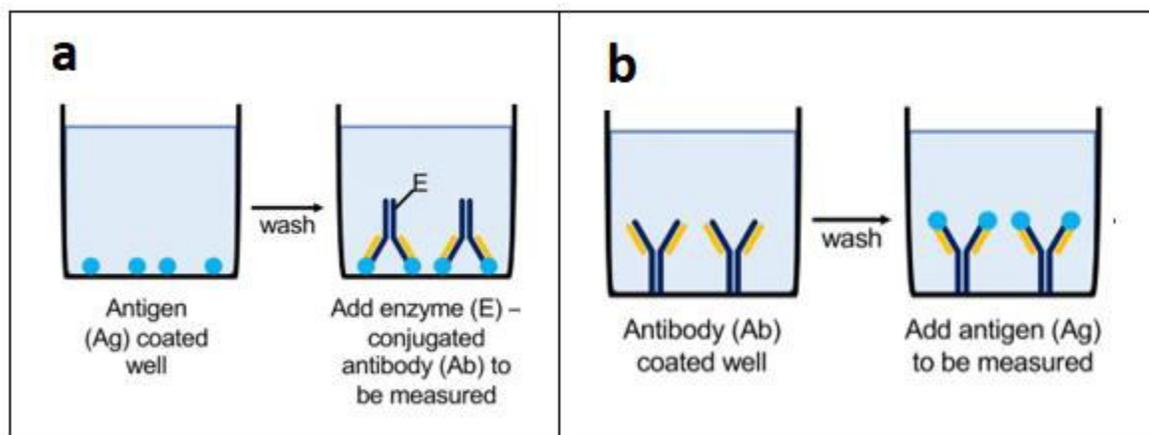


La muestra biológica añadida a cada uno de los pocillos (normalmente un caldo de crecimiento con la especie biológica de interés) contiene proteínas (proveniente de la bacteria o virus) que se unen contra el Ag/Ab del soporte de poliestireno de los pocillos (Alhajj & Farhana, 2022).

Figura 2.a, b.

Presentación esquemática de la unión entre las moléculas (anticuerpo/antígeno).

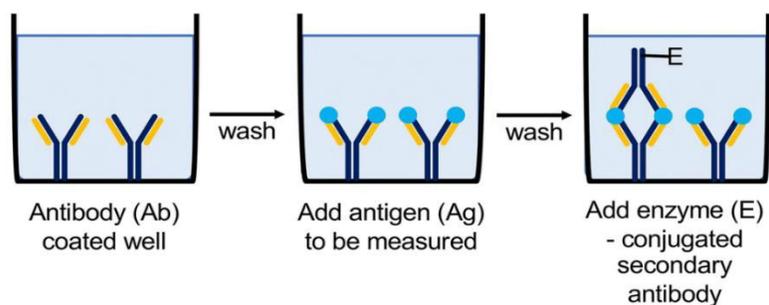
<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03239-6>



En cada uno de los pocillos se añade el conjugado. Este, está constituido por un antígeno o anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina y como sustrato fluorescente el 4 -metil-umbeliferil fosfato (Díaz-de-Quijano et al., 2020; Yolken & Leister, 1982). Cuando el conjugado antígeno-anticuerpo-enzima se forma se requiere realizar un lavado a base de Solución salina tamponada (150 mmol/L) con Tris (TBS) – Tween (pH 7.6) + conservantes para retirar los compuestos no unidos anteriormente. El paso de lavado se realiza una o dos veces en cada paso del protocolo si es necesario (Shekarchi et al., 1985).

Figura 3.

Esquema del conjugado antígeno o anticuerpo marcado con la enzima (En caso del método ELFA se usa una enzima fluorescente). <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03239-6>.



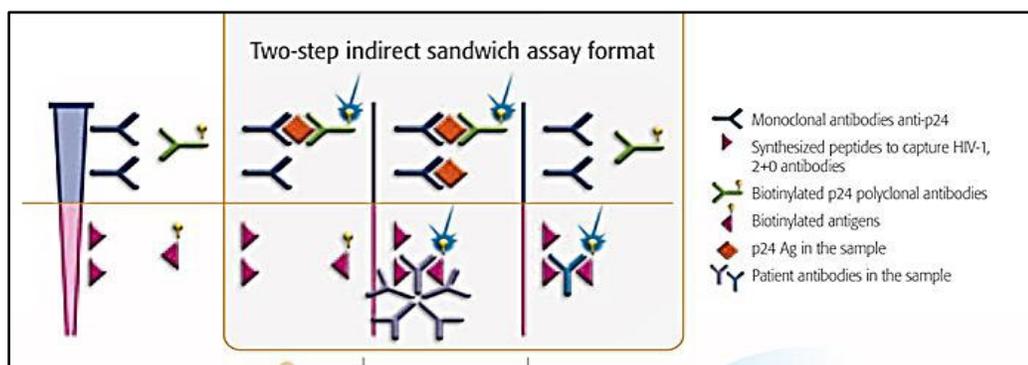
A continuación, la enzima conjugada hidroliza el 4 -metil-umbeliferil fosfato a 4 -metilumbeliferona, resultando en un producto fluorescente.

La concentración de fluorescencia depende de la cantidad de la enzima fosfatasa presente que a su vez depende de la concentración del antígeno o anticuerpo objetivo presente en la muestra (Razuoli et al., 2018).

Figura 4.

Esquema de la reacción final del método ELFA para el antígeno p24 en VIH.

<https://www.biomerieux-diagnostics.com/vidasr-hiv-panel-0>



2.2 Método de Inmunoensayo Enzimático Automatizado VIDAS, (Vitek Immunodiagnostic Assay System)

Salmonella sp. es una de las bacterias más frecuentemente reportadas en brotes por intoxicación de alimentos. El tiempo que se emplea para la detección de este microorganismo es de suma importancia clínica, los métodos convencionales están basados en medio de cultivo de enriquecimientos y medios selectivos (Popa & Papa, 2021). La introducción de métodos inmunológicos y moleculares ha permitido una identificación específica de las especies de *Salmonella*.

El VIDAS (Vitek Immunodiagnostic Assay System) se basa en la especificidad y afinidad de un anticuerpo monoclonal, fijado a una fase estacionaria, por el antígeno somático (O) y antígeno flagelar (H) de este microorganismo, detectando secuencial y automáticamente a *Salmonella*. (Acosta et al., 2013).

Gracias a una tecnología innovadora que incluye proteínas de fago recombinantes, el ensayo VIDAS *Salmonella* (SPT) permite la detección de *Salmonella* en productos alimentarios humanos y animales y en el entorno ambiental (Biomerieux, s. f.).

2.3 Materiales

a. Insumos

- 25 g o 25 ml de muestra de alimentos
- 225 ml de Agua Peptona Tamponada (BPW)
- Bolsas Stomacher
- Suplemento para *Salmonella* sp.
- Alcohol 70%

- Kit VIDAS

Kit VIDAS	Abreviación	Contenido/Descripción
60 Strips SPT	STR	Pocillos cubiertos con una etiqueta, con papel de aluminio sellado.
60 SPT SPRs	SPR	Cubierto con proteínas específicas para receptores de <i>Salmonella</i> .
SPT Estándar (1 x 6 ml)	S1	Receptores de <i>Salmonella</i> purificados e inactivados + conservante + estabilizador de proteínas. El intervalo de confianza se indica en la tarjeta MLE después de la siguiente mención: Estándar (S1) Rango de valores de prueba.
SPT Positive Control	C1	Receptores de <i>Salmonella</i> purificados e inactivados +

(1 x 6 ml)		<p>conservante + estabilizador de proteínas.</p> <p>El intervalo de confianza se indica en la tarjeta MLE después de la siguiente mención: "Control C1 (+) Rango de valores de prueba"</p>
<p>SPT Control negativo</p> <p>(1 x 6 ml)</p>	C2	<p>Solución salina tamponada con TRIS (TBS) (150 mmol/l) - Tween pH 7,6 + conservante.</p> <p>El valor máximo aceptable para la prueba se indica en la tarjeta MLE después de la siguiente mención: "Control C2 (-) Rango de valores de prueba".</p>
1 Tarjeta MLE (Master Lot Entry)		Especificaciones de los datos maestros de fábrica necesarios para calibrar la prueba a realizar.

b. Equipos

- Refrigeradora

- Balanza
- Autoclave
- Incubadora
- Computadora
- Stomacher mixer
- Propipeta
- Pipetas de 10 ml
- Equipo VIDAS
- Equipo *Heat and Go*

2.3.1 *Procedimiento*

El laboratorio de microbiología tiene un nivel de bioseguridad 2, por ende, antes de realizar cualquier procedimiento el analista debe de estar implementado con equipo de protección personal (EPP), en este caso una bata blanca o bata desechable, mascarilla, guantes, gorros desechables y lentes de protección.

Antes de iniciar con el protocolo de interés, desinfectamos el área con alcohol al 70%. Utilizamos la balanza para pesar 25 gr de muestra y la colocamos en una bolsa estéril o stomacher. Suplementamos la muestra con 225 ml de BPW + 1 ml de suplemento. La concentración de PBW y Suplemento es la siguiente:

$$\text{Suplemento} = \frac{\text{Volumen de PBW}}{225 \text{ ml}}$$

Cada ronda de análisis debe ir de la mano con los controles respectivos, un control positivo, negativo y control del medio de cultivo. El control positivo consta de una cepa de *Salmonella* ATCC (13076, 12325, 29934 o 9842), el control negativo de *Proteus hauseri* y el control del medio de cultivo de BPW+Suplemento.

Antes de incubar cada muestra debe ser homogenizada en el Stomacher por unos segundos. Luego, incubamos las muestras por 18-24 horas a $42 \pm 1^\circ\text{C}$.

Después de la incubación transferimos 500 μl del sobrenadante de las muestras, control negativo y control del medio de cultivo hacia los pocillos de los strips VIDAS. En el caso del control positivo solo se transfiere 125 μl por pocillo del strip.

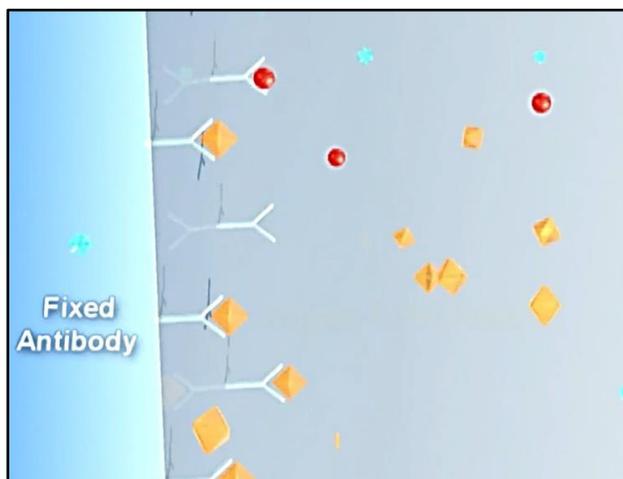
Colocar las tiras (STR) en un bloque de calentamiento (*Heat and Go*) y llevar a 131°C por 5 ± 1 min. Retirar las tiras y dejar enfriar de 10-15 minutos. Colocar las tiras (STR) y los SPT SRPs en los cabezales de VIDAS.

El equipo realiza los siguientes procesos:

El SPT SRPs está recubierto con proteínas específicas (anticuerpos) para *Salmonella* que al unirse con los antígenos forman el Ac-Ag de este primer paso (Figura 5). Para asegurar esta unión se realiza un primer lavado. Después de la formación del Ac-Ag el siguiente pocillo de la tira (STR) contiene el anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina el cual se une al compuesto Ac-Ag (Figura 6). Se realiza el segundo lavado. Finalmente, el último pocillo contiene la enzima 4 -metil-umbeliferil fosfato que al hacer contacto con el nuevo compuesto formado se hidroliza formando 4 -metilumbeliferona emitiendo una fluorescencia (Figura 7).

Figura 5.

Unión anticuerpo-antígeno. <https://www.biomerieux.com/>

**Figura 6.**

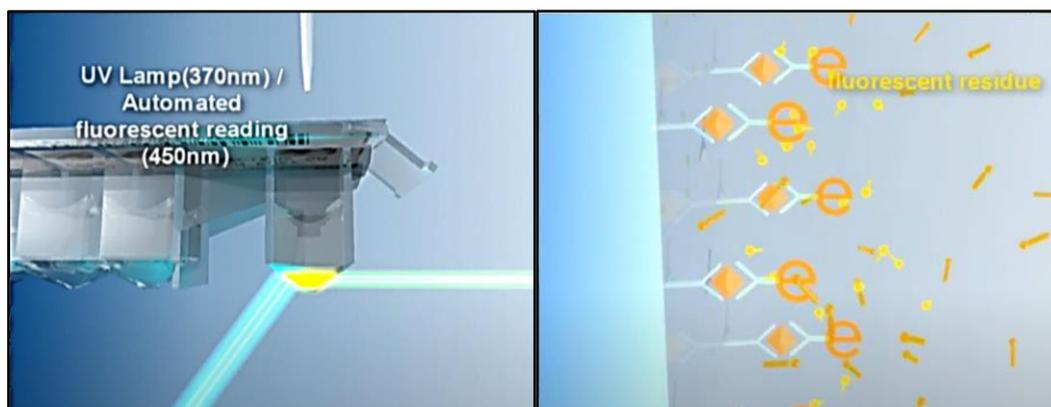
Anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina. <https://www.biomerieux.com/>



Figura 7.

Hidrólisis de la 4 -metil-umbeliferil fosfato a 4 -metilumbeliferona .

<https://www.biomerieux.com/>



2.3.2 Interpretación de Resultados

Una vez el protocolo para *Salmonella* haya finalizado, los resultados son analizados automáticamente por la computadora anexada al equipo VIDAS. El equipo arroja dos lecturas, la primera se realiza cuando se introducen las tiras (STRs), es decir, antes del ingreso de los SPT SRPs y, la segunda lectura se realiza después de la incubación del sustrato y la enzima que está en el interior de los SPT SRPs.

El Valor de Fluorescencia Relativa (RFV) se calcula restando la lectura de fondo con la lectura final. El RFV obtenido de cada muestra es interpretado por los instrumentos de la siguiente manera:

$$\text{Valor de la prueba} = \frac{\text{RFV de la muestra}}{\text{RFV del estándar}}$$

Interpretación de los puntos de corte:

Umbral del valor de prueba	Interpretación
< 0.25	Negativo
≥ 0.25	Positivo

- Un resultado con un valor inferior al valor umbral indica que la muestra de interés no tiene *Salmonella* o posiblemente contiene una concentración de *Salmonella* inferior al límite de detección.
- Un resultado con un valor de prueba mayor o igual al valor umbral indica que la muestra está contaminada con *Salmonella*.
- Un resultado invalido se notifica cuando la lectura de fondo está por encima de un punto de corte predeterminado (lo que indica una contaminación de bajo nivel del sustrato) o cuando no hay un estándar disponible para el número de lote de las tiras (STRs) de ensayo de la muestra.

III) APORTES MÁS DESTACABLES A LA EMPRESA

El laborar en el Laboratorio de Microbiología, me ha permitido realizar varios aportes a la empresa. A continuación, se describen los aportes más resaltantes:

- Realización de Documentos de Referencia (DR's) con respecto a los alcances de algunos métodos de ensayo (APHA, AOAC, ISO, etc). Los documentos contenían información resumida del procedimiento de los métodos de ensayo, en los cuales los analistas podían apoyarse al ejecutar los ensayos de las muestras.

-La detección de *Salmonella* por medio del equipo VIDAS, en SGS S.A.C es uno de los principales servicios que brindan resultados en tiempos reducidos, por lo cual, el manejo del equipo requiere de criterios puntuales por parte del analista, siendo un punto crucial tomar de decisiones en la emisión de los resultados finales.

-Verificación de hojas de seguridad de insumos y reactivos ingresados al laboratorio, después de dicha verificación, ingresar la información de cada insumo o reactivo en una plataforma digital para llevar un mejor control y manejo de los mismos; esto, con el fin de obtener información trazable en las próximas auditorías.

-Análisis y cálculo de Veracidad en tablas de Excel para el Área de Calidad del Laboratorio, con el fin de evaluar el desempeño de los analistas, que posteriormente, son solicitadas en Auditorías por las Autoridades de Calidad pertinentes.

IV) CONCLUSIONES

-El método VIDAS para la detección de *Salmonella* sp es un servicio de alta demanda en el Laboratorio de Microbiología de S.G.S, puesto que ofrece al cliente la seguridad de contar con resultados confiables en tiempo reducido.

- Los controles de calidad en las fronteras son cada vez más exigentes para la exportación de productos de origen animal, por lo que se necesitan de novedosas metodologías alternativas que permitan detectar a los patógenos de manera oportuna y rápida.

- El método VIDAS, es un inmunoensayo con proteínas recombinantes de fagos que posee gran especificidad y sensibilidad para la detección de *Salmonella*, con resultados en menos de 24 horas, lo cual es beneficioso para los clientes que requieren resultados en el menor tiempo posible.

V) RECOMENDACIONES

-Antes del uso de reactivos, se debe de verificar que cuenten con número de lote y fecha de vencimiento.

-Separar muestras de comidas con las de harina de pescado para que al correrlas se minimice el riesgo de contaminación.

-Verificar que se digite correctamente los códigos de las muestras para evitar confusión en la lectura de resultados.

-Se podría extender el uso de este método automatizado para otras bacterias de interés.

VI) REFERENCIAS

- Acosta, L., Pinedo, J., Hernández, E., & Villarreal, J. (2013). Comparación de los métodos de inmunoensayo enzimático automatizado (VIDAS) y PCR para la detección de *Salmonella* spp. en expendios de la ciudad de Santa Marta (Colombia). *Salud Uninorte*, 29(2), 174-182.
- Alfaro-Mora, R.(2018). Aspectos relevantes sobre *Salmonella sp* en humanos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 34 (3), 111.
- Alhaji, M., & Farhana, A. (2022). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
- Anderson, R., Mueller, R., Reese, S., & Wehner, A. (2017). Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent assay for thyroxine measurement in cat and dog sera. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(3), 278-286.
<https://doi.org/10.1177/1040638717696442>
- BioMérieux España. (s/f). bioMérieux España. Recuperado el 17 de enero de 2023, de <https://www.biomerieux.es>
- Boguszewska, K., Szewczuk, M., Urbaniak, S., & Karwowski, B. T. (2019). Review: Immunoassays in DNA damage and instability detection. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(23), 4689-4704. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03239-6>
- Burgos, J. T., & Alberti, C. L. (2019). Comparación de dos métodos rápidos para la detección de *Salmonella spp.* con un método convencional. *ALERTA Revista Científica del Instituto Nacional de Salud*, 2(1), 15–21. <https://doi.org/10.5377/alerta.v2i1.7524>

- Dave, J. R., Taylor, P., Grange, J. M., & Gaya, H. (1986). A new enzyme-linked fluorescence assay (ELFA) for use with peroxidase-antibody conjugates: A comparison with ELISA for the quantitation of IgM antibodies to hepatitis B core antigen. *Journal of Medical Microbiology*, *21*(3), 271-274. <https://doi.org/10.1099/00222615-21-3-271>
- Diaz-de-Quijano, D., Stratmann, C. N., & Berger, S. A. (2020). DIY enzyme labelled fluorescence alcohol (ELFA) standard production protocol to quantify single-cell phosphatase activity (SCPA) of microplankton. *Heliyon*, *6*(11), e05582. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05582>
- Martínez, P. M., Torres, A. R., Ortiz de Lejarazu, R., Montoya, A., Martín, J. F., & Eiros, J. M. (1999). Human Immunodeficiency Virus Antibody Testing by Enzyme-Linked Fluorescent and Western Blot Assays Using Serum, Gingival-Crevicular Transudate, and Urine Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(4), 1100-1106.
- Popa, G. L., & Papa, M. I. (2021). Salmonella spp. infection - a continuous threat worldwide. *Germs*, *11*(1), 88–96. <https://doi.org/10.18683/germs.2021.1244>
- Razzuoli, E., Vencia, W., Fedele, V., Mignone, G., Lazzara, F., Rubini, D., Vito, G., Porcario, C., Bozzetta, E., & Ferrari, A. (2018). Evaluation and validation of an alternative method to detect *Campylobacter* spp. In dairy products. *Italian Journal of Food Safety*, *7*(2), Article 2. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.7180>
- Rohonczy, K., Zoller, L., Hermann, Z., Fodor, A., Mráz, B., & Tabajdi-Pintér, V. (2014). Comparison of an automated ELFA and two different real-time PCR techniques for Salmonella detection in poultry samples. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica*, *61*(3), 261-272. <https://doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.3.2>

- Shekarchi, I. C., Sever, J. L., Nerurkar, L., & Fuccillo, D. (1985). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with enzyme-linked fluorescence assay with automated readers for detection of rubella virus antibody and herpes simplex virus. *Journal of Clinical Microbiology*, *21*(1), 92-96. <https://doi.org/10.1128/jcm.21.1.92-96.1985>
- Yolken, R. H., & Leister, F. J. (1982). Comparison of fluorescent and colorigenic substrates for enzyme immunoassays. *Journal of Clinical Microbiology*, *15*(5), 757-760.
- Yolken, R. H., & Stopa, P. J. (1979). Enzyme-linked fluorescence assay: Ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, *10*(3), 317-321.
- Yu, Y., Wang, P., Cui, Y., & Wang, Y. (2018). Chemical Analysis of DNA Damage. *Analytical Chemistry*, *90*(1), 556-576. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04247>

VII) ANEXOS

Anexo 1. Flujoograma de trabajo utilizado para este estudio

