



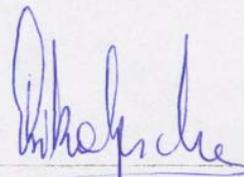
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria

Comparación de dos técnicas de diagnósticos de *Salmonella spp.* en
harina de pescado

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Grado de LICENCIADO EN
MEDICINA VETERINARIA.

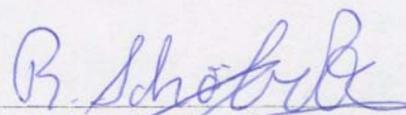
Alberto Alejandro Schlicht Stange
Valdivia Chile 1997

PROFESOR PATROCINANTE :

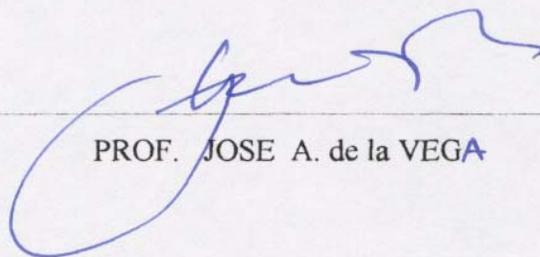


DRA. ERIKA GESCHE ROBERT

PROFESORES CALIFICADORES :



PROF. RENATE SCHOEBITZ



PROF. JOSE A. de la VEGA

FECHA DE APROBACION :

16 de Abril 1997.

Al amor y abnegación de mis padres

ÍNDICE

	Pág.
1 RESUMEN	1
2 SUMMARY	2
3 INTRODUCCIÓN	3
4 MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1 Material	9
4.2 Método	9
4.2.1 Método tradicional para aislamiento de <i>Salmonella spp.</i>	10
4.2.2 Método de separación inmunomagnética (IMS) para aislamiento de <i>Salmonella spp.</i>	11
5 RESULTADOS	
5.1 Resultados de los análisis de 20 muestras iniciales contaminadas con <i>Salmonella spp.</i>	13
5.2 Resultados de los análisis de 10 repeticiones a una sola muestra positiva a <i>Salmonella spp.</i>	15
6 DISCUSIÓN	16
7 BIBLIOGRAFÍA	19
8 ANEXOS	
Nº1 Esquema de procedimiento de método tradicional	23
Nº2 Esquema de procedimiento de método IMS	24

1. RESUMEN

Como aporte al conocimiento de técnicas de aislamiento de *Salmonella spp.* en harina de pescado, se compararon los resultados de los análisis realizados a muestras de harina de pescado previamente diagnosticadas positivas a *Salmonella spp.* Se realizaron 20 análisis de muestras distintas y 10 repeticiones de una sola muestra según la técnica tradicional estandarizada por SERNAP (norma ISO 6579/90) y la técnica de separación inmunomagnética (IMS).

Se determinó la presencia/ausencia de *Salmonella spp.* según la metodología convencional pesando 25 g de muestra añadiéndose a 225 ml de caldo de enriquecimiento no selectivo, incubándose a 37°C por 20 h. El enriquecimiento selectivo prosigue sembrando 1 ml de este caldo en el caldo Selenito Cistina, incubando a 37°C por 24 h y 0,1 ml en el medio de Rappaport-Vassiliadis, incubando a 42°C por 24 h. Se aísla la bacteria sembrando en placa en los agares selectivos Rambach y XLD, incubándolos a 37°C durante 24 h y las colonias sospechosas se someten a confirmación bioquímica.

La técnica de IMS se basa en un tipo diferente de enriquecimiento selectivo requiriendo también de una etapa previa de enriquecimiento no selectivo, incubándose durante 5 y 20 h a 37°C. A partir del caldo incubado se obtienen 2 ml y se añaden 100 µl de la suspensión de perlas magnéticas recubiertas de anticuerpos anti-*Salmonella spp.*, se agitan a temperatura ambiente durante 1 h. El aislamiento presuntivo y la confirmación bioquímica se realizan siguiendo los mismos procedimientos de la técnica tradicional.

En los 20 análisis de muestras diferentes los resultados evidenciaron la presencia de *Salmonella spp.* en 5 muestras del total analizadas por la técnica tradicional (5/20), en cambio usando la IMS se aisló *Salmonella spp.* en 3 muestras del total (3/20). En la prueba de repetibilidad, la técnica convencional determinó positivas 6 muestras del total (6/10), mientras que la IMS aisló *Salmonella spp.* en 8 oportunidades (8/10) del total de ensayos.

Ambas técnicas obtuvieron resultados similares de diagnóstico y una repetibilidad equivalente, siendo la IMS una alternativa confiable en los análisis rutinarios de *Salmonella spp.*

Palabras claves: Harina de pescado, *Salmonella*, Técnicas de diagnóstico, Separación Inmunomagnética.

2. SUMMARY

As a trend to perfection the isolation methods of *Salmonella spp.* in fish meal, the results of the analysis made in fish meal samples previously diagnosed positive to *Salmonella spp.* were compared. 20 analysis in different samples were made and 10 repetitions of one single sample according to traditional technique standardized by Sernap (norm ISO 6579/90) and the immunomagnetic separation technique (IMS).

The presence/absence of *Salmonella spp.* was determined according to the conventional methodology weighing 25 g of sample adding it to 225 ml of non selective enrichment broth, incubating it at 37°C for 20 h. The selective enrichment process continues by transferring 1 ml of this broth in to Selenite Cistine broth. It is incubated at 37°C for 24 h. Also 0,1 ml of the non selective broth is transferred to Rappaport-Vassiliadis broth. It is incubated at 42°C for 24 h. *Salmonella spp.* is isolated by plating on selective agars Rambach and XLD, incubated at 37°C for 24 h and the suspect colonies submitted to biochemical confirmation.

The IMS is a different selective enrichment wich also requires a previously non selective enrichment. Incubating it at 37°C for 5 h and 20 h. From this broth 2 ml are obtained and 100 µl of the suspension immunomagnetic beads coated by anti-*Salmonella* antibodies are added. They are gently vortexed at room temperature for 1 h. The presuntive isolation and the biochemical confirmation are the same as for the traditional technique.

In the 20 analysis of different samples the results showed the presence of *Salmonella spp.* in 5 samples of the total analyzed by traditional technique (5/20), while using IMS, 3 samples of the total were isolated (3/20). In the repeatability test, the traditional method determined that 6 samples of the total were positive (6/10), while the IMS isolated *Salmonella spp.* in 8 opportunities (8/10) of the total trials.

Both methods showed similar results of diagnosis and an equivalent repeatability, being the IMS a trustful alternative in the habitual analysis of *Salmonella spp.*

Keywords: Fish Meal, *Salmonella*, Diagnostic technique, Immunomagnetic separation.

3. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis sigue siendo la más importante causa de enfermedades alimentarias a través del mundo (Flowers, 1988; Stelma y McCabe, 1992). La Organización Mundial de la Salud, OMS, y la asociación mundial de higienistas de alimentos de origen animal, indican que la salmonelosis es un problema real o potencial en todas las regiones del mundo, siendo esta enfermedad una de las zoonosis notificadas de mayor prevalencia en los países en desarrollo (Sato, 1985; Acha y Szyfres, 1986; OMS, 1988).

Durante la última década se ha observado un aumento en los casos de salmonelosis humana tanto en EE.UU y Canadá (Bryan, 1981), Inglaterra y Gales del Sur (Palmer and Rowe, 1986) como en otros países de la Comunidad Europea (Anónimo, 1991). Según estimaciones de diversos autores, el número de casos de salmonelosis humana que ocurren cada año en los EE.UU variarían entre 740.000 a 5.300.000, en cambio en los países en desarrollo es difícil evaluar la situación puesto que se carece de datos de vigilancia epidemiológica (Acha y Szyfres, 1986); en los animales domésticos se ha estimado una tasa de infección de 1 a 3%. Esta situación ha motivado una campaña destinada a prohibir el ingreso de harinas de pescado contaminadas con esta bacteria (Anónimo, 1991) a los países preocupados del control de salmonelosis.

Según la Organización Mundial de la Salud (1988) no existe ninguna otra zoonosis tan compleja en su epidemiología y control como la salmonelosis, pero simplificando la cadena de infección por *Salmonella spp.* sería: el alimento animal contaminado infectaría a los animales y a los productos alimentarios derivados de éstos y el hombre finalmente se infectaría al consumir estos alimentos (Sato, 1985).

Existe mundialmente una tendencia a demandar un mejoramiento de calidad en todos los productos alimentarios motivado por el concepto de "*mejoramiento de la calidad de vida*". Es así como en el caso de las harinas de pescado los mercados compradores demandan nuevos requerimientos en aspectos tales como frescura de la materia prima, grado de digestibilidad de las proteínas, estabilidad de los aminoácidos, ausencia de sustancias tóxicas, etc. (Anónimo, 1991).

Desde hace muchos años las autoridades sanitarias han exigido a los países productores y exportadores de harinas de pescado la entrega de certificados donde se compruebe la ausencia de contaminación con *Salmonella spp.*, contenido de aflatoxinas y un

mínimos de enterobacterias (Belmente y Maureira, 1991), puesto que las harinas de pescado son uno de los productos más frecuente y gravemente contaminados con este agente patógeno (Blood y Radostits, 1992).

Actualmente la harina de pescado se fabrica según método de prensado en húmedo, que contempla dos fases:

- Cocción para coagular proteínas, con lo que se libera agua y aceite retenido.
- Prensado que libera los elementos coagulados, con lo que se obtiene una fase sólida (torta prensada) que contiene de un 60 a un 80% de la materia seca exenta de aceite (proteínas, huesos) y el aceite y una fase líquida (líquido de prensado) que contiene el resto de los sólidos (aceite, proteínas disueltas y en suspensión, vitaminas y elementos minerales). La mayor parte de los lodos de este líquido quedan eliminados por centrifugación en un decantador, y tras ello se separa el aceite por centrifugación. La fase acuosa (jugos de pescado) y de las centrifugas (residuos viscosos líquidos) se concentra en evaporadores de fases múltiples (aprox. 130° C), y el producto concentrado se mezcla perfectamente con la torta prensada, que tras ello es deshidratada, habitualmente en dos fases de desecación (aprox. a 100° C). La materia seca se muele alcanzando la granulometría adecuada y se almacena en sacos o a granel (FAO, 1971).

Según Henríquez (1988) las harinas de pescado consumidas en el mercado nacional no siempre cumplen con los requisitos exigidos para la exportación, aunque los usuarios demanden los mismos. Las razones radican en que siendo éste un mercado residual, muchas veces se transan en él partidas rechazadas de la exportación. A esto se suma que algunas de las industrias elaboradoras de harina de pescado ubicadas en la zona Centro-Sur aplican procesos caracterizados por un escaso control, especialmente térmico y disponen de una capacidad de proceso desbalanceada en relación a las capacidades de almacenamiento de las materias primas, lo que se traduce en prolongados períodos de espera de ésta previo a su procesamiento. Asimismo la calidad de la molienda incide en la granulometría y presencia de grumos asociada a condiciones de humedad, proliferación de hongos, aflatoxinas, etc.

Los peces no enferman de salmonelosis, pero se puede encontrar *Salmonella spp.* en la superficie del pez, como en las agallas, escamas, etc., cuando se extraen de aguas contaminadas (Le Minor, 1981); además durante los procesos de fabricación existen etapas de tratamiento térmico que destruirían a las bacterias (cocción, secado y peletizado) (Anónimo, 1991). Generalmente en la etapa final del proceso (horneado, molienda y ensacado) es donde el producto puede ser recontaminado por el contacto con superficies o por la acción de manipuladores portadores (Thatcher y Clark, 1973). Además existen otras etapas potenciales de contaminación que transcurren durante el almacenamiento en canchas y bodegas, como asimismo durante el transporte, manipulación y desembarco en los puertos finales (Anónimo,

1991), situación que se agrava cuando no son tomadas en cuenta las debidas condiciones sanitarias y de higiene, manteniendo el producto durante un tiempo prolongado en condiciones de temperatura y humedad que posibiliten el crecimiento bacteriano. (Frazier, 1967; Lin y col, 1988; Flowers, 1988; Telzak, y col, 1990). Por su parte tanto Frazier (1967), como la OMS (1988), Flowers (1988), Oosterom (1991) y Blood y Radostits (1992) señalan la importancia epidemiológica de contaminación a través de fomites y vectores, sean éstos humanos o animales (aves, roedores, perros, gatos, cucarachas, etc.) y aguas superficiales.

La *Salmonella spp.* se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, móvil, no esporulado, aerobio o anaerobio facultativo tal como lo describe Edwards y Ewing (1972). Existen aproximadamente 2200 serotipos clasificados sobre la base de 67 grupos del antígeno O (somáticos) y numerosos antígenos H (flagelares) descubiertos hasta la fecha (Acha y Szyfres, 1986; OMS, 1988; Schaechter y col, 1994). La *Salmonella spp.* está relacionada tanto morfológica y fisiológicamente con los otros géneros de la familia de las enterobacterias, produciendo ácido y gas de la glucosa, manitol, maltosa y sorbitol. No fermenta sacarosa, lactosa, ni salicina. No forma indol, no coagula la leche, ni licúa la gelatina (Merchant y Packer, 1965; Jawetz y col, 1992; Brock y Madigan, 1993). Crece a temperaturas entre 8°C y 45°C pero en forma óptima a 37°C y es destruida a temperaturas elevadas, como en las condiciones utilizadas en el proceso de pasteurización de la leche. La *Salmonella spp.* sobrevive en general en productos de pH neutro y no ácidos, requiriendo de una humedad mínima que genere una actividad de agua (a_w) que posibilite su crecimiento, siendo la a_w mínima de entre 0,93 a 0,95 (Frazier, 1967; Acha y Szyfres, 1986). En caso de encontrarse en condiciones favorables de nutrientes, humedad, a_w , pH y temperatura, el crecimiento de la población de *Salmonella spp.* tiene en sus primeras horas un período inductivo de crecimiento aritmético, para experimentar posteriormente un crecimiento exponencial que permite llegar en pocas horas a una población superior al millón de colonias por gramo (Belmonte y Maureira, 1991).

Esta bacteria ingresa al organismo vía oral y la invasión del hospedador ocurre a través de la pared intestinal, particularmente en el íleon terminal y ciego, progresando hasta los ganglios linfáticos mesentéricos (Blood y Radostits, 1992). En el epitelio intestinal es captada por elementos del sistema retículo endotelial y trasladada al hígado y bazo, donde se multiplica presumiblemente como un facultativo intracelular en macrófagos (Schaechter y col, 1994). De esta forma las fiebres entéricas son enfermedades sistémicas con diseminación del patógeno en los órganos internos (Neira, 1984).

La salmonelosis, como enfermedad zoonótica, se caracteriza por un cuadro clínico típico en el hombre, descrito por Acha y Szyfres (1986) y Jawetz y col (1992) como una enterocolitis acompañada de vómitos, náuseas, diarrea y deshidratación, dolor intestinal y

de cabeza, fiebre y escalofríos. El período de incubación es de 6 a 72 h luego de la ingestión del alimento, siendo de curso benigno y de recuperación clínica entre 2 a 4 días. Sin embargo se presentan algunos casos agudos que pueden derivar en una bacteremia con lesiones focales en meninges, encéfalo, pulmones y huesos (Jawetz y col, 1992). Por su parte en los animales, la infección puede manifestarse clínicamente o no, cursando con un cuadro gastroentérico, diarrea aguda y crónica, fiebre, decaimiento, generando los consiguientes problemas de crecimiento, pérdida de peso, disminución en los parámetros productivos, producción de leche y de carne (Thomson, 1988), en hembras gestantes provoca abortos (Acha y Szyfres, 1986). Cuando el animal es infectado por *Salmonella spp.* puede convertirse en un caso clínico o en un portador activo que libera microorganismos constante o intermitentemente a través de las deposiciones (Blood y Radostits, 1992).

Esta es la razón por la cual se debe evitar que los insumos de origen animal, utilizados como materia prima para la elaboración de alimento para los mismos animales, contengan *Salmonella spp.* puesto que implica un riesgo potencial para la salud pública (ICMSF, 1978).

El volumen y valor de las exportaciones de harina de pescado chilenas es significativo dentro de la economía nacional, requiriendo métodos confiables en la certificación de calidad para productos de exportación, buscándose métodos de alta sensibilidad y rapidez en los resultados de los diagnósticos de presencia de *Salmonella spp.* La estandarización de procedimientos fueron desarrollados para controlar alimentos y comidas (Pietzsch, 1985), debiendo los métodos cumplir requisitos como ser: confiables, prácticos, utilizable por cualquier analista y de efectividad comprobada (Speck, 1976).

El método de análisis microbiológico tradicional para la determinación de *Salmonella spp.* en alimentos, se basa en favorecer la multiplicación del microorganismo e inhibir el desarrollo de la flora competitiva, esto debido a que la *Salmonella spp.* habitualmente está presente en baja concentración y acompañada de otras bacterias entéricas (OMS, 1988). La técnica comprende cuatro etapas sucesivas: preenriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo en dos caldos distintos, aislamiento mediante siembra en agares selectivos y confirmación bioquímica (Speck, 1976; ICMSF, 1978). A medida que se estudia mejor esta técnica, se van desarrollando nuevas formulaciones para los medios (caldos y agares) de crecimiento selectivo, los cuales aportan más y mejores condiciones nutritivas y relación de temperaturas para lograr el mejor crecimiento bacteriano, como ha sido la incorporación del medio de Rappaport-Vassiliadis y el agar de Rambach (OMS, 1988, Moriñigo y col, 1986; Moriñigo y col, 1990).

Cada una de las etapas anteriores requieren de tiempos de incubación que fluctúan entre 6 y 48 h (Acha y Szyfres, 1986; Mansfield and Forsythe, 1993), acusando resultados negativos y positivos después de 4 ó 7 días respectivamente, por lo tanto la principal desventaja es el tiempo que se requiere para obtener un resultado negativo (Belmente y Maureira, 1991), además siendo inconveniente y caro como un método rutinario para el control de muestras (Cudjoe y col, 1994b).

En este sentido se ha desarrollado una nueva técnica de análisis microbiológico denominada *separación inmunomagnética (IMS)*, la cual reduce el tiempo de diagnóstico además de poseer una sensibilidad superior a la obtenida en los métodos de análisis convencionales (Mansfield and Forsythe, 1993).

La IMS anti-*Salmonella* es un tipo de enriquecimiento selectivo diferente (Skjerve and Olsvik, 1991; Cudjoe y col, 1993), que consiste en la adición de una suspensión de pequeñas y uniformes perlas magnéticas, las cuales están rodeadas de anticuerpos específicos anti-*Salmonella* unidas a su superficie, a un caldo de enriquecimiento no selectivo el cual contiene la muestra a analizar. Las perlas están incorporadas en una solución salina de fosfato tamponada (PBS) 0,01 M, pH 7,4 el cual contiene 0,1% de seroalbúmina humana (HSA) y 0,02% de azida de sodio (Na N3).

La técnica IMS está basada en el principio de unión de la bacteria a la superficie de las perlas magnéticas mediante una reacción antígeno-anticuerpo específica, a través de la cual se favorece la unión selectiva de la *Salmonella spp.* presente en los alimentos. El método requiere un preenriquecimiento previo en un caldo no selectivo el cual optimiza la sensibilidad de la técnica (Cudjoe y col, 1994b).

El método IMS es rápido, tomando aproximadamente 30 minutos en el enriquecimiento selectivo y es altamente específico, ya que altera la relación entre la población bacteriana *Salmonella-no Salmonella* en favor de los serovariantes *Salmonella spp.* puesto que actúa promoviendo la unión perla-bacteria y no a través de la inhibición de la otra flora bacteriana presente (Cudjoe y col, 1994a; Cudjoe y col, 1994b).

Posteriormente el complejo perla-bacteria es separado de la suspensión inicial, lo cual se logra mediante la aplicación de un campo magnético utilizando una gradilla especial, la cual posee magnetos en su interior, permitiendo así que las perlas se adosen a la pared de los

tubos plásticos adyacentes a los magnetos (VICAM s/f)¹.

Una vez separadas ambas fracciones, se debe eliminar el material en suspensión resultante a través de sucesivos lavados los cuales se realizan con los tubos en la gradilla magnética evitando de esta forma la aspiración indeseada de las perlas, luego añade nuevamente solución de lavado y se agitan los tubos para la resuspensión de las perlas (VICAM s/f).

Finalizado el procedimiento de IMS se pueden seguir distintos métodos de aislamiento de *Salmonella spp.*, como cultivo en placas en agares diferenciales y medios de confirmación bioquímica o serológica, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Polimerase Chain Reaction (PCR), conductancia eléctrica, etc. (VICAM s/f).

Como aporte al conocimiento de técnicas de aislamiento de *Salmonella spp.* en harina de pescado, el presente estudio pretende implementar la técnica de análisis de *Salmonella spp.* por el método de separación inmunomagnética (IMS) y comparar el grado de sensibilidad que posee este método, frente a la técnica convencional para el análisis de esta bacteria en harina de pescado.

¹ Laboratorio VICAM L.P, User's Guide versión 1.0 for *Salmonella* and verify. 313 Pleasant street, Watertown, MA 02172. USA

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 MATERIAL

De diferentes laboratorios nacionales de certificación de calidad se obtuvieron 20 muestras de 100 g y 1 muestra de 2,5 kg. de harina de pescado, las cuales fueron calificadas como positivas a *Salmonella spp.* por estos laboratorios.

Se requirió para desarrollar la técnica convencional de:

- Material básico de un laboratorio de bacteriología.
- Medios de cultivo específicos para el aislamiento de *Salmonella spp.*
- Reactivos para realizar las diferentes pruebas bioquímicas.

Se necesitó para desarrollar la técnica IMS, además del material anterior, lo siguiente:

- Agitador de rotación inclinada, modelo ARI-20T.
- Gradilla magnética, Capture Rack, VICAM, Watertown, MA.
- Suspensión de perlas inmunomagnéticas² para *Salmonella spp.*

4.2 MÉTODO

En el laboratorio de microbiología de alimentos del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria de la UACH se analizaron las muestras aplicando simultáneamente las técnicas de análisis:

- a) Aislamiento tradicional de *Salmonella spp.* según indicaciones de SERNAP (ISO, 1990).
- b) Aislamiento de *Salmonella spp.* aplicando la técnica de separación inmunomagnética (IMS), según técnica recomendada por el laboratorio VICAM L.P.

Las metodologías de ensayo aplicadas fueron:

- a) Análisis comparativo de 20 muestras diferentes de harina de pescado, independientes entre sí, procedentes de distintas industrias y/o lotes de fabricación.
- b) Análisis comparativo de 10 repeticiones de una sola muestra de harina de pescado, también inicialmente positiva a *Salmonella spp.*

² VICAM, L.P. Watertown, MA. USA

Se evaluaron los resultados analizando los datos obtenidos a través de las dos técnicas de diagnóstico de *Salmonella spp.* y comparando los resultados positivos a la presencia de la bacteria sobre el total de muestras analizadas, con cada metodología.

4.2.1. Método tradicional para aislamiento de *Salmonella spp.*:

El aislamiento de *Salmonella spp.* conlleva 4 etapas fundamentales y sucesivas (ICMSF, 1978 ; Mansfield and Forsythe, 1993)

- a) Enriquecimiento no selectivo.
- b) Enriquecimiento selectivo
- c) Aislamiento en placa con agares diferenciales.
- d) Confirmación bioquímica.

La metodología empleada en la técnica tradicional se basó en la norma (ISO, 1990), esquematizada en el anexo N°1, que se inicia con el enriquecimiento no selectivo añadiendo 25 g de muestra de *Salmonella spp.* a 225 ml de agua peptonada tamponada^{3*}, incubando a 37°C durante 20 h, continuando con el enriquecimiento selectivo en el cual se utilizan 2 tipos de caldos diferentes, para lo cual a partir del caldo peptonado anterior se añaden 1 ml a 10 ml de caldo Selenito Cistina ®⁴ (SC) y 0,1 ml a 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis ®⁴ (RV), incubándose el primero a 37°C y el segundo a 42°C, ambos durante 24 h.

Luego y a partir de los caldos selectivos anteriores se procede a aislar las bacterias mediante siembra por estría con asa en placas de Petri con los agares diferenciales Xilosa Lisina Desoxicolato, XLD ®⁴ y Rambach ®⁴, incubando ambos agares durante 24 h a 37°C.

Las colonias sospechosas con características típicas de *Salmonella spp.* en cada medio de cultivo diferencial son sometidas a confirmación bioquímica para determinar:

- Acidificación de Glucosa, Sacarosa y Lactosa⁴, en agar TSI.
- Descarboxilación de lisina⁴, en agar LIA.
- Producción de ácido sulfídrico (H₂S), en agar TSI y LIA.
- Deaminación de fenilalanina⁴.
- Producción de indol³
- Producción de acetil metilcarbinol (Voges-Proskauer)³.
- Producción de β-galactosidasa³.

³ Preparado según ISO, (1990).

⁴ Laboratorio Merck, S.A

Para confirmar presencia de *Salmonella spp.* se usó la clave según *Pipes (1982)*:

Glucosa	(+)	Fenilalanina	(-)
Sacarosa	(-)	Indol	(-)
Lactosa	(-)	Voges-Proskauer	(-)
Lisina	(+)	β -galactosidasa.	(-)
H ₂ S	(+) ó (-)		

4.2.2. Método de separación inmunomagnética (IMS) para el aislamiento de *Salmonella spp.*:

La separación inmunomagnética se realizó en cuatro fases, según indica el manual de uso de laboratorio VICAM, esquematizados en el anexo N°2.

- a) Preparación de la muestra y enriquecimiento no selectivo.
- b) Captura: unión del anticuerpo superficial de las perlas con la *Salmonella spp.* presente en la muestra.
- c) Aislamiento presuntivo de la bacteria en agar diferencial.
- d) Confirmación bioquímica de las colonias sospechosas.

La muestra se prepara añadiendo 25 g de alimento en 225 ml de caldo Trypticase Soya⁵, incubando durante 5 h y 20 h a 37°C, luego de este enriquecimiento no selectivo se traspasan 2 ml del cultivo anterior a tubos plásticos de 5 ml y se añaden 100 μ l de suspensión de perlas inmunomagnéticas⁶. Los tubos se colocan en un rotor orbital inclinado en 32° durante 1 h a temperatura ambiente, a fin de permitir la unión antígeno-anticuerpo y evitar que las partículas sedimenten.

El tiempo de preenriquecimiento se alargó de 5 h a 20 h, pese a las recomendaciones del laboratorio, debido a los resultados obtenidos en la etapa pre-experimental y avalado por los resultados de D'Aoust y col (1990, 1992a y 1992b) y Cudjoe y col (1994b).

Posteriormente se colocan los tubos 10 minutos en la gradilla magnética la cual separa las perlas con *Salmonella spp.* en su superficie, de cualquier otro elemento en suspensión. Las perlas quedan adosadas a la pared de los tubos, permitiendo así realizar dos lavados con 2 ml de solución fosfato tamponado (PBS), con intervalos de 5 minutos, los cuales eliminan el material no unido a las perlas conjuntamente con el sobrenadante aspirado con la

⁵ Laboratorio Becton Dickinson, S.A.

⁶ Laboratorio VICAM L.P, Watertown, MA, USA

micropipeta de 200-1000 μ l. Esta operación se realiza con los tubos dentro de la gradilla magnética evitando de esta forma eliminar accidentalmente las perlas.

Finalmente se resuspenden las perlas en 0,2 ml de solución de PBS, se agita y luego se siembra con asa la totalidad de la suspensión sobre una placa con agar selectivo Rambach incubando las placas durante 24 h a 37°C y repicando las colonias sospechosas para su posterior confirmación bioquímica, siguiendo la misma metodología señalada en el punto 4.2.1

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE 20 MUESTRAS DISTINTAS ORIGINALMENTE POSITIVAS A *SALMONELLA SPP.*

TABLA N° 1

Resultados del aislamiento de *Salmonella spp.* de cada una de las 20 muestras distintas analizadas según los métodos IMS y tradicional.

Muestra N°	Método IMS	Método tradicional
1	+	+
2	+	+
3	-	-
4	-	-
5	-	+
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	+	+
13	-	-
14	-	-
15	-	+
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-

De la tabla N°1 se desprende que de un total de 5 muestras positivas a *Salmonella spp.*, 3 muestras resultaron ser positivas por ambos métodos y 2 muestras positivas sólo al método tradicional.

En la tabla N°2 se visualiza el efecto del tiempo de enriquecimiento no selectivo en el resultado de aislamiento de *Salmonella spp.* aplicando el método de separación inmunomagnética.

TABLA N° 2

Número de muestras positivas y negativas según el tiempo de incubación de 5 y 20 h aplicado al método de IMS de aislamiento de *Salmonella spp.* (n=20)

Muestras	5 h de enriquecimiento no selectivo	20 h de enriquecimiento no selectivo
Positivas	0/20	3/20
Negativas	20/20	17/20

En la tabla N° 3 se muestra la influencia de los medios de enriquecimiento selectivos, caldo Selenito Cistina (SC) y caldo Rappaport-Vassiliadis (RV); agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y agar Rambach, en el aislamiento de *Salmonella spp* mediante el método tradicional de análisis.

TABLA N° 3

Comparación de resultados de las cinco muestras positivas a *Salmonella spp* aisladas según los medios de enriquecimiento selectivos y agares de aislamiento presuntivo usados en el método tradicional de aislamiento (n=20)

Muestras	caldos selectivos		agares de aislamiento	
	SC	RV	XLD	Rambach
Positivas	3/5	4/5	3/5	4/5
Negativas	2/5	1/5	2/5	1/5

5.2 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS EN 10 REPETICIONES DE UNA SOLA MUESTRA ORIGINALMENTE POSITIVA A *SALMONELLA SPP.*

TABLA N° 4

Resultados del aislamiento de *Salmonella spp.* de las 10 repeticiones a una sola muestra positiva analizadas según métodos de separación inmunomagnética y tradicional.

Repetición N°	Método IMS	Método tradicional
1	+	+
2	+	-
3	+	-
4	+	+
5	-	+
6	+	+
7	+	+
8	+	-
9	+	-
10	-	+

De la tabla N°4 se desprende que las 10 repeticiones fueron positivas a *Salmonella spp.*, siendo positivas 4 repeticiones por ambos métodos, asimismo 4 repeticiones fueron positivas sólo al método IMS y 2 ensayos resultaron ser positivos sólo al método tradicional.

En la tabla N° 5 se observan los resultados obtenidos usando la técnica de separación inmunomagnética, comparando los tiempos de enriquecimiento no selectivo necesarios para el crecimiento bacteriano.

TABLA N° 5

Número de repeticiones positivas y negativas según tiempos de incubación de 5 y 20 h aplicando el método de IMS de aislamiento de *Salmonella spp.* (n= 10)

Repeticiones	5 h de enriquecimiento no selectivo	20 h de enriquecimiento no selectivo
Positivas	0/10	8/10
Negativas	10/10	2/10

6. DISCUSIÓN

El material reactivo utilizado para aislar y confirmar la presencia de *Salmonella spp.* en los alimentos, en este caso harina de pescado, es muy específico, siendo ampliamente descritos por Edwards y Ewing (1972); Speck (1976); ICMSF (1978), siguiéndose estrictamente cada uno de los pasos en la preparación y esterilización recomendados por los diferentes laboratorios fabricantes de los medios usados, tanto para los requeridos en la técnica tradicional como en los necesarios para desarrollar la técnica de separación inmunomagnética.

La técnica tradicional aisló positivamente *Salmonella spp.* en 5 muestras de un total de 20 muestras inicialmente positivas (5/20), mientras que la IMS logró confirmar en la misma cantidad total de muestras sólo 3 positivas (3/20), tal como se puede apreciar en la Tabla N°1. Del total de muestras aisladas positivas (5/20), sólo 3 muestras fueron detectadas positivas por ambos métodos de aislamiento y por todos los diferentes caldos y agaros que componen la técnica tradicional (Tabla N°3).

Se interpretan estos escasos resultados favorables en muestras originalmente positivas a *Salmonella spp.* como influenciados por una serie de factores que deben ser tomados en consideración: se desconoce el tiempo transcurrido entre el muestreo de la harina de pescado, los análisis positivos en los laboratorios certificadores de calidad y los análisis que fueron realizados en el laboratorio en Valdivia. El almacenamiento prolongado de muestras puede afectar la supervivencia de la bacteria en el alimento debido a bajo contenido de humedad de la harina de pescado, entre 15% y 20%, condición desfavorable para la supervivencia bacteriana pese a poseer una actividad de agua entre 0,93 y 0,95; además las condiciones de almacenamiento en los laboratorios son de temperaturas constantes sobre 18°C y de baja humedad ambiente, aumentando la susceptibilidad bacteriana a la desecación. Estas condiciones de temperatura y humedad, conjuntamente con el pH, son opuestas a las descritas por Le Minor (1981) como las favorables para la sobrevivencia de *Salmonella spp.* fuera del tracto digestivo.

La presencia de *Salmonella spp.* en harina de pescado es consecuencia de la recontaminación proveniente de diversas fuentes y por lo tanto la bacteria presente en el alimento está en una concentración muy baja. Esta condición determina dos situaciones: por una parte explicaría la insuficiencia de 5 h de enriquecimiento no selectivo en el método IMS para permitir la recuperación y crecimiento de las bacterias presentes en las muestras, como se observa en la Tabla N°2. En cambio cuando se prolongó a 20 h el enriquecimiento no selectivo los resultados fueron de 3 aislamientos positivos (3/20) sobre el total de muestras analizadas,

situación más evidente como se aprecia en la tabla N°5, referida a los 10 ensayos repetidos de una sola muestra en donde la prolongación de la incubación a 20 h permitió el aislamiento de *Salmonella spp* en 8 repeticiones del total (8/10). El menor tiempo de enriquecimiento no selectivo estaría basado en la reducción del tiempo final de diagnóstico, sostiene D'Aoust y col (1990). De este modo el menor tiempo de incubación supuestamente sería suficiente para permitir un mínimo crecimiento de bacterias dañadas, las cuales serían posteriormente atrapadas por la especificada de la reacción antígeno-anticuerpo de las perlas magnéticas. Esta disminución en el tiempo de incubación del enriquecimiento no selectivo podría ser útil en alimentos que contengan una alta concentración de *Salmonella spp*. y/o de alimentos que permitan la rápida proliferación y crecimiento de la misma, pero en el caso de las harinas de pescado se obtuvieron los mejores resultados de crecimiento con 20 h de enriquecimiento no selectivo posibilitando el adecuado aislamiento de *Salmonella spp*.

Por otra parte las muestras que contienen una baja concentración de bacterias por gramo además requieren de una acabada homogeneización previa al enriquecimiento no selectivo, operación crítica que permitiría una adecuada distribución de *Salmonella spp*. en la totalidad del alimento a analizar, aumentando la probabilidad de inclusión en los 25 g sometidos al análisis.

Según Busse (1995) los medios de enriquecimiento selectivos son considerados como de importancia crítica en el aislamiento de *Salmonella spp*. , se recomienda sembrar al menos un medio selectivo diferente aumentando de esta forma la detección de la bacteria. En el presente estudio se observó que en las dos muestras detectadas positivas sólo mediante la técnica tradicional, la presencia de *Salmonella spp*. en cada muestra fue aislada tanto en medios de enriquecimiento selectivos distintos como en agares diferenciales selectivos también distintos.

Evaluando los resultados positivos obtenidos en las 20 muestras distintas y según se observa en la Tabla N°3, el caldo Rappaport-Vassiliadis obtuvo resultados comparables a los detectados en el caldo Selenito Cistina, aislándose a partir del primer caldo de enriquecimiento 4 muestras positivas (4/5) y del segundo 3 muestras (3/5) de un total de 5 ensayos positivos.

Estos resultados mantienen la tendencia de los obtenidos en el trabajo de D'Aoust y col (1992a), quienes sostienen el rol determinante del enriquecimiento selectivo a altas temperaturas como un represor de la microflora competitiva, en comparación con un medio incubado a temperaturas convencionales como el caldo Selenito Cistina, permitiendo

finalmente incrementar el aislamiento presuntivo en los medios selectivos de agar en placa y evitando el enmascaramiento de *Salmonella spp.* por los otros microorganismos entéricos.

En los ensayos realizados a las 20 muestras distintas y empleando la técnica tradicional, el agar Rambach evidenció resultados de crecimiento comparables a los obtenidos en agar XLD. Como se aprecia en la Tabla N°3, el agar Rambach permitió el crecimiento de colonias positivas en 4 muestras de un total de 5 muestras detectadas positivas (4/5), mientras que el agar XLD permitió el crecimiento de sólo 3 muestras del total de ensayos positivos (3/5).

El uso de agar Rambach mediante la incorporación de la solución cromógena en su composición permite diferenciar claramente las bacterias *Salmonella spp.* de otro tipo de bacterias, observándose las colonias sospechosas *Salmonella spp.* de color rosado, mientras que las colonias azul o de color violeta corresponden a otras enterobacterias, facilitando de esta forma la identificación de colonias sospechosas.

Una técnica diagnóstica es fiable cuando las repeticiones dan lugar a resultados similares, por lo tanto la repetibilidad es una característica de una técnica fiable (Thrusfield, 1990). En las 10 repeticiones a una sola muestra positiva original, y como se advierte en la Tabla N°4, todas las repeticiones fueron detectadas positivas, de las cuales 4 repeticiones fueron positivas a ambos métodos de análisis. La IMS confirmó 4 ensayos que no fueron detectados positivos por la técnica tradicional, mientras que ésta detectó 2 ensayos que no fueron aislados positivos mediante la IMS. Se consideran fiables las técnicas de IMS y tradicional, puesto que de la totalidad de los ensayos, detectaron 8 y 6 repeticiones positivas respectivamente.

Asimismo y como se observa en la Tabla N°5, se repite la tendencia de la insuficiencia de 5 h de enriquecimiento no selectivo en el método IMS, donde no hubo aislamientos positivos con 5 h de enriquecimiento no selectivo (0/10), mientras que con 20 h de enriquecimiento las detecciones positivas aumentan a 8 sobre un total de 10 ensayos (8/10).

De los análisis realizados a las 20 muestras distintas se puede concluir que ambas técnicas obtuvieron resultados similares entre sí, caracterizadas por un escaso aislamiento de *Salmonella spp.* bajo condiciones inadecuadas de muestras debido a su antigüedad. Por lo tanto la validez de las técnicas, tomado en el sentido de medir lo que se supone que debe medir (Thrusfield, 1990), se podría ratificar a la luz de los resultados

obtenidos en la prueba de repetibilidad. Ante todo queda de manifiesto la importancia primaria, para lograr un buen resultado en cualquier técnica de diagnóstico, de la obtención de una adecuada muestra, estimándose fundamental para lograr un diagnóstico eficaz de *Salmonella spp.* en alimentos elaborados que sufran procesos térmicos, como la harina de pescado, los procedimientos de muestreo, la cantidad y volumen de las unidades muestrales y el tiempo transcurrido entre la toma de muestra y los análisis de laboratorio.

La separación inmunomagnética obtuvo resultados finales comparables con los de la técnica tradicional, por lo tanto la IMS puede ser una alternativa confiable a los métodos de análisis rutinarios de *Salmonella spp.*, entregando resultados confiables 24 h más rápido que los obtenidos normalmente (Mansfield and Forsythe, 1993), puesto que requiere sólo 1 h para el enriquecimiento selectivo, en vez de las 24 a 48 h necesarias según D'Aoust y col. (1992b), pero si en vez de seguir los procedimientos de confirmación bioquímica y serológica se usan procedimientos de PCR o ELISA, el tiempo total de análisis se reduciría a 48 h (Mansfield and Forsythe, 1993).

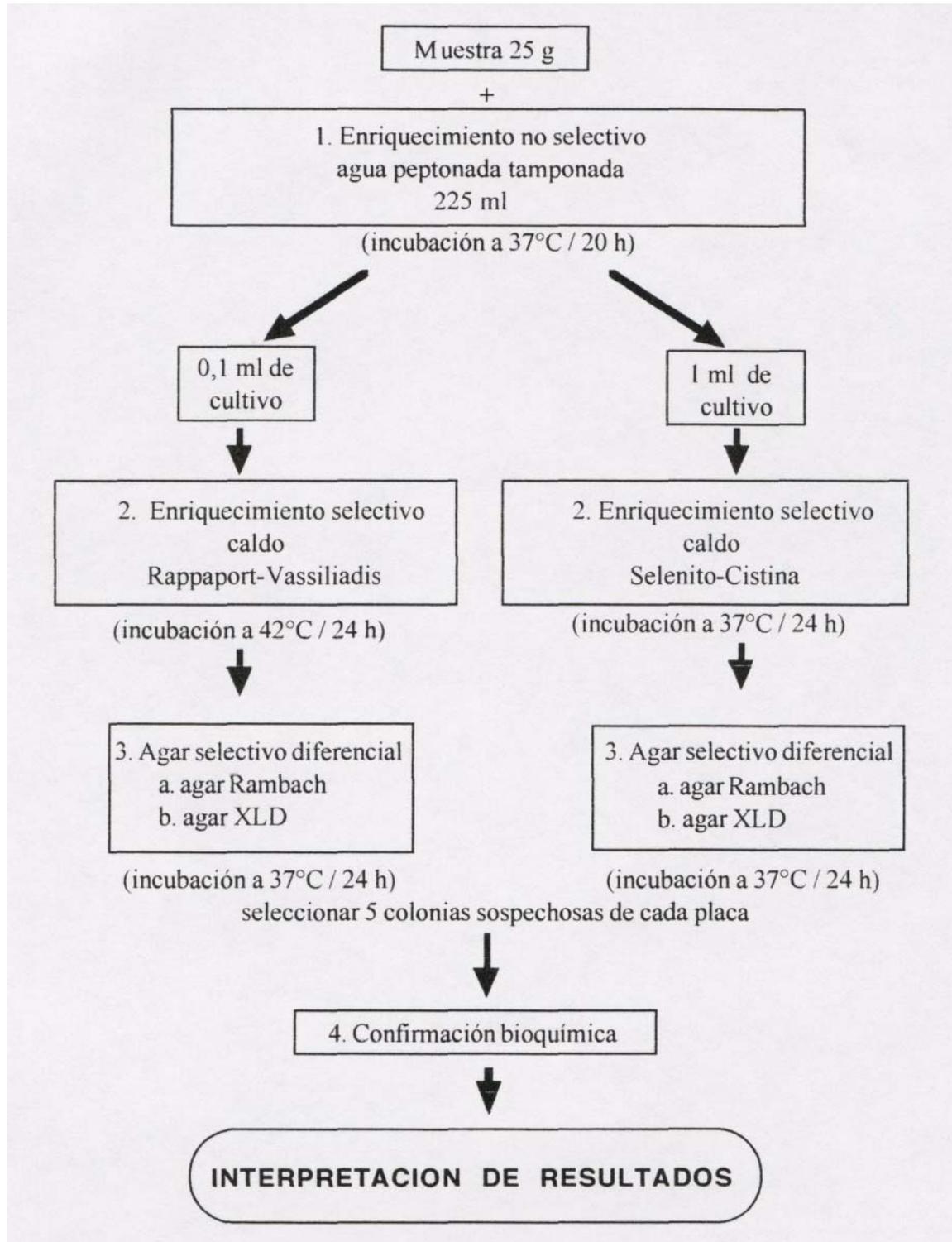
7. BIBLIOGRAFÍA

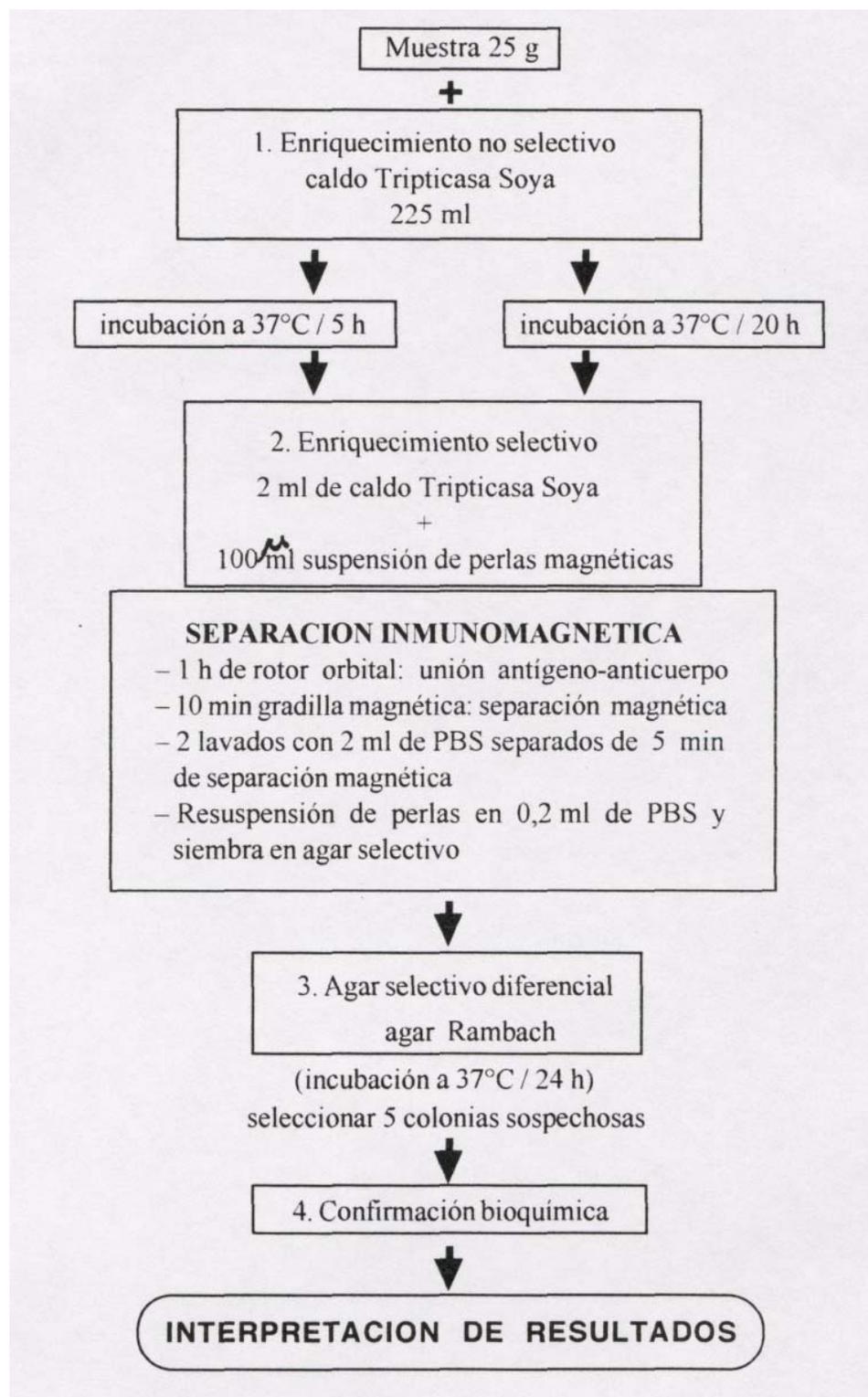
- Acha, P. N y B. Szyfres. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2° ed. publicación científica N° 503, OPS. Washington, D.C.
- Anónimo. 1991. La *Salmonella*: un desafío en la comercialización de harina de pescado. **Chile Pesquero**, 65: 49-52
- Belmente, M y P. Maureira. 1991. Determinación de *Salmonella* por conductancia. **Chile Pesquero**, 67: 34—41.
- Blood, D.C y O.M Radostits. 1992. Medicina Veterinaria. 7° ed. editorial Interamericana McGraw-Hill.
- Brock y Madigan, T.H y M. T, Madigan. 1993. Microbiología. 6° ed. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A.
- Bryan, F. L. 1981. Current trends in foodborne salmonellosis in the United States and Canada. **Journal of Food Protection** 44: 394. Citado por Flowers, 1988.
- Busse, M. 1995. Media for Salmonella. **International Journal of Food Microbiology** 26: 117-131.
- Cudjoe, K.S; P. D, Patel; E, Olsen; E, Skjerve and O, Olsvik. 1993. Immunomagnetic separation techniques for detection of pathogenic bacteria in foods. New **Techniques in Food and Beverage Microbiology. Society for Applied Bacteriology Technical Series**, 31: 17-29. Blackwell, London. Citado por Cudjoe y col, 1994 b
- Cudjoe, K. S; R, Krona; B, Gran and E, Olsen. 1994 a. Use of ferrous sulphate and immunomagnetic separation to recover *Salmonella enteritidis* from raw eggs. **International Journal of Food Microbiology**, 23; 149-158.
- Cudjoe, K. S; R, Krona and E, Olsen. 1994 b. IMS: a new selective enrichment technique for detection of *Salmonella* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, 23: 159-165.
- D'Aoust, J. Y; A. M, Sewell and A. Jean. 1990. Limited sensitivity of short (6 h) selective enrichment for the detection of foodborne *Salmonella*. **Journal of Food Protection** 53: 562-565.

- D'Aoust, J. Y; A. M, Sewell and E. Daley. 1992 a. Inadequacy of small transfer volume and short (6h) selective enrichment for the detection of foodborne *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, 55, (5): 326-328
- D'Aoust, J. Y; A. M, Sewell and A. Jean. 1992 b. Efficacy of prolonged (48 h) selective enrichment for the detection of foodborne *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, 15: 121-130.
- Edwards, P. R and W. H Ewing. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 3° ed. Burgess Publishing Company. Minnesota.
- Food and Agricultural Organization. FAO. 1971. La producción de harina y de aceite de pescado. **FAO Fish tech. pap.** (Es), pp: 142 - 154.
- Flowers, R. S. 1988. Bacteria associated with foodborne diseases. **Food Technology**, 4 (42): 179-185.
- Frazier, W.C. 1967. Food Microbiology. Intoxication and Food Infections. Ed. Mc Graw-Hill. New York.
- Henríquez, L. 1988. Mercado interno de harina y aceite de pescado. CORFO. Serie de estudios especiales AP 88/7.
- International Commission on Microbiological Specifications of Foods. ICMSF. 1978. Microorganisms in foods, their significance and methods of enumeration. 2° ed Editorial University of Toronto Press. Toronto. Canada
- International Organization for Standardization. ISO. 1990. International Standard 6579. Microbiology general guidance on methods for the detection of *Salmonella*. ISO. Geneva. Switzerland.
- Jawetz, E; J, Melnick y E, Adelberg. 1992. Microbiología Médica. 14° Ed. cap. 16. Ed manual moderno. México.
- Le Minor, L. 1981. The genus *Salmonella*. In: The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolations and Identification of Bacteria. Vol. II. Edited by Starr, M.P; H, Stolp; H.G, Trüper; A. Balows and H, Schlegel. Ed. Springer- Verlag Berlin Heidelberg.

- Lin, F. Y; J. G, Morris; D, Trump; D, Tilghman Jr.; P. K, Wood; N, Jackman; E, Israel and J. P, Libonati. 1988. Investigation of análisis outbreak of *Salmonella enteritidis* gastroenteritidis associated with consumption of eggs in a restaurant in chain in Maryland. **Am. J. Epidemiol**, 128: 839 - 844. Citado por Cudjoe y col, 1994a.
- Mansfield, L. P and S. J, Forsythe. 1993. Immunomagnetic separation as análisis alternative to enrichment broths for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, 16: 122-125.
- Merchant, I. A y R. A, Packer. 1965. Bacteriología y Virología Veterinarias. 2° ed español. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Moriñigo, M; J, Borrego and P, Romero. 1986. Comparative study of different methods for detection and enumeration of *Salmonella spp.* in natural water. **Journal of Applied Bacteriology** 61: 169-176.
- Moriñigo, M; M, Ascensión; R, Cornax; D, Castro and J, Borrego. 1990. Evaluation of different enrichment media for isolation of *Salmonella* from polluted seawater samples. **J. Microbiological Methods** 11, 1: 43-49.
- Neira, L. 1984. Caracterización físico-química y estudio de inmunogenicidad experimental de *Salmonella typhi* nativa y TY-2. Depto. laboratorios de Salud. Instituto de Salud Pública de Chile.
- Organización Mundial de la Salud. OMS. 1988. Control de Salmonelosis: importancia de la higiene veterinaria y de los productos de origen animal. Ginebra. **Serie de informes técnicos** 774.
- Oosterom, J. 1991. Epidemiological studies and proposed preventive measures in the fight against human salmonellosis. **International Journal of Food Microbiology**, 12: 41-52.
- Palmer, S. R and B, Rowe. 1986. Trends in *Salmonella* infections. PHLS Microb Dig. 3: 18. Citado por Flowers, 1988.
- Pipes, W. 1982. Bacterial indicators of Pollution. CRC Press. Florida.
- Pietzsch, O. 1985. Method of detection of *Salmonella* standardization and harmonization of the procedure. En: International Symposium on *Salmonella*, New Orleans, pp: 7 -13.
- Sato, S. 1985. Incidence, trends and control of *Salmonella* in food producing animals. En: International Symposium on *Salmonella*, New Orleans, pp: 27 - 34.

- Schaechter, M; G. Medoff y B. Eisenstein. 1994. Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas y enfoque mediante la resolución de problemas. 2° ed. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. Argentina.
- Skjerve, E and O. Olsvik. 1991. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods. **Int. J. Food Microbiology**, 14 : 11-18. Citados por Cudjoe y col, 1994b.
- Speck, M. 1976. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Published by American Public Health Association. Washington.
- Stelma, G and L, McCabe. 1992. Nonpoint pollution from animal sources and shellfish sanitation. **Journal of Food Protection** 55, 8: 649-656.
- Thatcher, F. S and D. S Clark. 1973. Análisis microbiológico de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- Thrusfield, M. 1990. Epidemiología Veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- Telzak, E.E; L.D, Budnick; M.S.Z, Greenderg; S, Blum; M, Shayegani; C.E, Benson and S, Schultz. 1990. A nosocomial outbreak of *Salmonella enteritidis* infection due to the consumption of raw eggs. N. **Engl. J. Med.**, 323: 394-397. Citados por Cudjoe y col, 1994a.
- Thomson, R.G. 1988. Special Veterinary Pathology. Intoxications and Food Infections. Editorial B.C Decker Inc. Burlington. Ontario.

ANEXO N°1**Esquema de análisis de *Salmonella spp.* según método tradicional**

ANEXO N°2Esquema de análisis de *Salmonella spp.* según método IMS

AGRADECIMIENTOS

- Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Erika Gesche, por la ayuda y estímulo en el desarrollo de este trabajo.
- Al laboratorio de Carlos Rivas, por la colaboración de instrumental.
- A la Srta. Mónica Sáez, Tecnólogo Médico del instituto de Medicina Preventiva Veterinaria por su desinteresada colaboración, gracias amiga.
- Al Dr. Ornar Henríquez, por su atención, tiempo y consejos cuando se lo requerí.
- A la Dra. Ximena Rojas, por su colaboración.
- A la T. M Renate Schoebitz, por su colaboración.
- A los amigos que de una u otra forma me ayudaron y apoyaron en la elaboración de este trabajo.
- A los amigos del Rugby que comparten mi alegría en estos momentos.