

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE PESQUERÍA



**“COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE
Salmonella spp. EN HARINA DE PESCADO DESCRITOS EN LA
NORMA ISO 6579-1:2017 Y VIDAS UP *Salmonella* SPT.”**

**TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL
PARA OPTAR TÍTULO DE
INGENIERO PESQUERO**

FRIDA YURI CALLUPE MARILUZ

LIMA – PERÚ

2022

Document Information

Analyzed document	Trabajo de suficiencia profesional 2022.pdf (D146035859)
Submitted	2022-10-10 18:43:00
Submitted by	David Julián Roldán Acero
Submitter email	droidan@lamolina.edu.pe
Similarity	5%
Analysis address	droidan.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

W	URL: http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/833/T_0524.pdf?sequence=1&isAllowed=y Fetched: 2022-01-18 00:02:00		4
SA	TESIS MIREYA QUISPHE (P).docx Document TESIS MIREYA QUISPHE (P).docx (D26663654)		2
SA	1A_Hurtado_Salirrosas_Soledad_Patricia_Título_Profesional_2017_docx..docx Document 1A_Hurtado_Salirrosas_Soledad_Patricia_Título_Profesional_2017_docx..docx (D40007908)		4
W	URL: https://www.hidrive.strato.com/wget/bwOsAKia Fetched: 2021-04-18 23:00:41		6
SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / INFORME 7.docx.pdf Document INFORME 7.docx.pdf (D142281352) Submitted by: csalaverry@lamolina.edu.pe Receiver: csalaverry.unalm@analysis.arkund.com		1
SA	ANTEPROYECTO JAN Y 2016 FINAL.docx Document ANTEPROYECTO JAN Y 2016 FINAL.docx (D19253079)		2
W	URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29803313/ Fetched: 2022-01-13 16:47:54		1
W	URL: https://www.iso.org/standard/76671.html Fetched: 2021-08-24 08:23:56		1
SA	submission.pdf Document submission.pdf (D110978318)		1
W	URL: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/perfil-salmonella-spp.pdf Fetched: 2019-11-21 18:14:03		2
SA	1561085862_896__Reporte_de_Inocuidad_-_Práctica_2.docx Document 1561085862_896__Reporte_de_Inocuidad_-_Práctica_2.docx (D54023486)		1

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE PESQUERÍA

**“COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella*
spp. EN HARINA DE PESCADO DESCRITOS EN LA NORMA ISO 6579-1:2017
Y VIDAS UP *Salmonella* SPT.”**

Presentado por:

FRIDA YURI CALLUPE MARILUZ

Trabajo de Suficiencia Profesional para optar el Título de:

INGENIERO PESQUERO

Sustentado y aprobado por el siguiente jurado:

.....
Mg. Sc. Tito Eduardo Llerena Daza
Presidente

.....
Ing. Nancy Martínez Ordinola
Miembro

.....
Mg. Sc. Daniel Percy Rojas Hurtado
Miembro

.....
Mg. Sc. David Julián Roldan Acero
Asesor

Lima 2022

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios al universo a mi esfuerzo y a mi voluntad por permitirme cumplir este trabajo, agradezco a mis padres Aníbal Callupe Arias y Amanda Mariluz Dolores por haberme dado el sostén emocional para continuar con este trabajo pese a las dificultades que han existido en el día a día, agradezco a mis hermanos en especial a mi hermana Nora Callupe Mariluz que me ha apoyado desde antes del inicio de mi carrera, agradezco a la oportunidad de poder trabajar en un laboratorio importante de microbiología como es NSF LAB PERU dónde adquirí los conocimientos, los recursos y materiales necesarios para poder realizar este trabajo.

Así mismo expreso mi agradecimiento y admiración a mi asesor David Julián Roldan Acero ya que su asesoría, sus conocimientos, su constancia, su interés, y el tiempo invertido en este proceso fueron fundamentales para poder continuar y culminar este trabajo que Dios lo proteja siempre.

ÍNDICE GENERAL

I	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Problemática.....	1
1.2	Objetivos	1
II	REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1	Definiciones generales	2
2.2	Industria de la harina de pescado en el Perú	4
2.3	Almacenamiento de harina de pescado	5
2.4	Productores de harina de pescado	5
2.5	Mercados de harina de pescado.....	7
2.6	Exportaciones de harina de pescado.....	8
2.7	Importancia de la alimentación animal con harina de pescado	10
2.8	Información microbiológica de harina de pescado.....	11
2.9	Salmonella.....	12
2.9.1	Clasificación Taxonómica	13
2.9.2	Condiciones para crecimiento de Salmonella spp.	14
2.9.3	Salmonelosis.....	15
2.9.4	Transmisión de Salmonella.....	15
2.9.5	Control de Salmonella spp.....	16
2.9.6	Salmonella spp. en la industria alimentaria	17
2.10	Técnicas de detección de <i>Salmonella</i> spp.	18
2.11	Medios de cultivo líquidos	19
2.12	Medios de cultivo Sólidos	21
2.13	Métodos para detección de Salmonella	24
2.13.1	Normalizados.....	24
2.13.2	No normalizados.....	25
2.14	Normas ISO.....	25
2.14.1	Método ISO 6579:2017	25
2.14.1.1	Pre-enriquecimiento.....	26

2.14.1.2	Enriquecimiento selectivo.	26
2.14.1.3	Siembra en medios solidos selectivos	26
2.14.1.4	Confirmación.....	26
2.14.1.5	Prueba serológica.....	27
2.14.2	ISO 16140-3.....	27
2.15	Validación de método.....	27
2.16	Verificación.....	28
2.16.1	Protocolo para la verificación de métodos.....	28
2.16.2	Parámetros para la verificación de un método.....	29
2.17	Método alternativo VIDAS UP <i>Salmonella</i> spp. (SPT).....	30
2.17.1	Componentes	30
2.17.1.1	Equipo VIDAS.	30
2.17.1.2	Equipo heat&go.....	33
2.17.2	Principio.....	34
2.18	Cepas microbiológicas ATCC.....	36
III	DESARROLLO DEL TRABAJO.....	37
3.1	Ejecución del trabajo	37
3.2	Experiencia profesional en microbiología.....	37
3.3	Condiciones de trabajo	38
3.4	Documentos de referencia	39
3.5	Métodos utilizados	40
3.5.1	Método de referencia	40
3.5.2	Método alternativo	40
3.6	Muestras de trabajo	40
3.7	Cepas bacterianas	41
3.8	Equipos utilizados para determinación de <i>Salmonella</i>	42
3.9	Medios de cultivo y reactivos.....	43
3.10	Preparación de suspensión inicial.....	44
3.11	Preparación de suspensión de cepa	44

3.12 Verificación del método alternativo	46
3.13 Prueba de inclusividad y exclusividad	49
3.13.1 Absorbancia de Cepas dianas y no dianas	49
3.13.2 Inoculación de cepas diana (inclusividad)	49
3.13.3 Inoculación de cepas no diana (exclusividad)	50
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
4.1 Muestras analizadas de harina de pescado en el año 2017-2020	51
Recuento de colonias	56
4.2 Resultados de muestras analizadas por el método VIDAS UP <i>Salmonella</i>	58
4.3 Límite de aceptabilidad	58
4.4 Resultados de Inclusividad y exclusividad para la detección de <i>Salmonella</i>	59
V CONCLUSIONES	60
VI RECOMENDACIONES.....	62
VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
VIII ANEXOS.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Principales mercados de harina de pescado (Miles US\$ FOB)</i> -----	7
Tabla 2 <i>Empresas exportadoras de Harina de pescado</i> -----	10
Tabla 3 <i>Requisitos microbiológicos para harina de pescado</i> -----	11
Tabla 4 <i>Taxonomía de Salmonella spp.</i> -----	14
Tabla 5 <i>Parámetros de Crecimiento de Salmonella spp.</i> -----	14
Tabla 6 <i>Resultado de VIDA UP Salmonella SPT</i> -----	35
Tabla 7 <i>Absorbancia y Recuento de suspensiones</i> -----	42
Tabla 8 <i>Lectura de absorbancia de Salmonella enteritidis tiphymurium</i> -----	46
Tabla 9 <i>Promedio de Absorbancias obtenidos</i> -----	49
Tabla 10 <i>Muestras de Harinas de Pescado analizadas para Salmonella por el método ISO 6579</i> -----	51
Tabla 11 <i>Muestras de harinas de pescado analizadas para Salmonella por año</i> -----	53
Tabla 12 <i>Muestras con presencia de Salmonella spp. en el año 2019-2020</i> -----	54
Tabla 13 <i>Comparación de métodos ISO 6579 y VIDAS UP Salmonella SPT</i> -----	56
Tabla 14 <i>Microorganismos obtenidos (ufc/ml) en 0.585 (absorbancia promedio)</i> -----	57
Tabla 15 <i>Resultados de muestras analizadas por el método VIDAS UP Salmonella</i> -----	58
Tabla 16 <i>Resultados de Inclusividad y exclusividad para la detección de Salmonella</i> -----	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Producción de harina de pescado por país en miles de toneladas (TM)</i>	6
Figura 2 <i>Producción de harina de pescado de Perú</i>	6
Figura 3 <i>Exportaciones de harina de pescado en 2021</i>	8
Figura 4 <i>Exportación de Harina de Pescado en miles de US\$ FOB</i>	9
Figura 5 <i>Salmonella</i>	13
Figura 6 <i>Reacción bioquímica de lisina descarboxilasa</i>	20
Figura 7 <i>Colonias de Salmonella en Agar Verde Brillante</i>	21
Figura 8 <i>Colonias de Salmonella en Agar XLD</i>	22
Figura 9 <i>Salmonella typhimurium ATCC14028 en Agar TSI</i>	23
Figura 10 <i>Reacción positiva de agar urea de Christensen</i>	24
Figura 11 <i>Resultados de Inclusividad y exclusividad para la detección de Salmonella</i>	31
Figura 12 <i>Tira que contiene reactivos</i>	32
Figura 13 <i>Suplemento para Salmonella spp.</i>	33
Figura 14 <i>Equipo heat&go</i>	34
Figura 15 <i>Sistema y tecnología ELFA</i>	35
Figura 16 <i>Harina de pescado</i>	40
Figura 17 <i>Cepas microbiológicas</i>	41
Figura 18 <i>Preparación de suspensión de cepa</i>	45
Figura 19 <i>Inoculación de suspensión inicial incubada</i>	48
Figura 20 <i>Conos y Tiras de VIDAS UP Salmonella</i>	48
Figura 21 <i>Variación de muestras analizadas de harina de pescado por meses</i>	52
Figura 22 <i>Muestras de harinas de pescado analizadas por año</i>	53
Figura 23 <i>Muestras de harina de pescado con presencia de Salmonella spp.</i>	55

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Lectura de absorbancia medido en el equipo ELISA	68
Anexo 2: Esquema de verificación de la concentración de microorganismos	69
Anexo 3: Sistema para registro de muestras.....	70
Anexo 4: Flujograma de metodología ISO: 2017 AMD 2020	71
Anexo 5: Flujograma de método VIDAS UP Salmonella SPT	72
Anexo 6: Conos insertados en equipo VIDAS	73
Anexo 7: Medios de cultivo deshidratado	73
Anexo 8: Suero para <i>Salmonella</i>	74
Anexo 9: Antisuero O y H para <i>Salmonella</i>	74
Anexo 10: Reporte del método VIDAS UP <i>Salmonella</i> SPT.....	75
Anexo 11: Tabla de interpretación de las pruebas bioquímicas para <i>Salmonella</i>	76

RESUMEN

El presente trabajo es realizado para obtener el título profesional como ingeniera pesquera por la modalidad de suficiencia profesional y tiene como objetivos comparar los resultados de dos metodologías para la detección de *Salmonella* spp. en harina de pescado, los cuales están descritas en la norma ISO 6579 y en el método alternativo VIDAS UP *Salmonella* SPT; así como evaluar el número de muestras de harina de pescado analizados en el laboratorio de microbiología para la detección de *Salmonella* spp por el método ISO 6579 en los años 2017 a 2021, con esta evaluación se observó que el número de resultados positivos fueron aproximadamente 1.4 % de la totalidad de muestras analizadas y se llegó a la conclusión que sería favorable utilizar el método alternativo para detectar *Salmonella* spp. en harina de pescado ya que mejoraría el tiempo de entrega de resultados negativo a 24 horas.

Para este trabajo se realizó la verificación del método para ello se utilizaron como referencia los siguientes documentos: norma ISO 16140, informe resumido VIDAS UP *Salmonella* (VIDAS SPT Ref.30707) y procedimientos internos del laboratorio NSF PERÚ, para el uso del equipo y fundamento del método alternativo se recibió capacitación y entrenamiento de parte del personal de la empresa SIMED, asimismo se aplicó la experiencia y conocimiento adquiridos como analista microbiólogo, para realizar la verificación del método se contamina artificialmente con 3 ufc a 5 ufc de cepas microbiológicas de interés con diferentes ATCC a las suspensiones iniciales, y se utilizó una suspensión de control sin inocular llamado blanco estas suspensiones fueron analizados por el método, se analizó los parámetros de aceptabilidad, exclusividad, inclusividad de los resultados emitidos por este método.

Palabras clave: Harinas de pescado, *Salmonella*, ISO 6579, Vidas UP SPT, ATCC.

ABSTRACT

The present work is carried out to obtain the professional title as a fishing engineer by the modality of professional sufficiency and its objectives are to compare the results of two methodologies for the detection of *Salmonella* spp. in fishmeal, which are described in the ISO 6579 and in the alternative method VIDAS UP *Salmonella* SPT; as well as evaluating the number of fishmeal samples analyzed in the microbiology laboratory for the detection of *Salmonella* spp. by the ISO 6579 method in the years 2017 to 2021, with this evaluation it was observed that the number of positive results was approximately 1.4% of all the samples analyzed and it was concluded that it would be favorable to use the alternative method to detect *Salmonella* spp. in fishmeal since it would improve the delivery time of negative results to 24 hours. For this work, the verification of the method was carried out, for which the following documents were used as reference: ISO 16140 standard, summary report VIDAS UP *Salmonella* (VIDAS SPT Ref.30707) and internal procedures of the NSF PERU laboratory, for the use of the equipment and foundation. From the alternative method, training was received from the staff of the SIMED company, as well as the experience and knowledge acquired as a microbiologist analyst was applied, to carry out the verification of the method, it was artificially contaminated with 3 to 5 CFU of microbiological strains of interest with different ATCC to the initial suspensions, and a control suspension without inoculation called blank was used. These suspensions were analyzed by the method, the parameters of acceptability, exclusivity, and inclusivity of the results issued by this method were analyzed.

Keywords: Fishmeal, *Salmonella*, ISO 6579, Vidas UP SPT, ATCC.

I INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática

Estudios anteriores reportan que, si no se mantiene un debido control sobre la harina de pescado, podrá dar lugar a la contaminación con microorganismos patógenos, como *Salmonella* spp., Enterobacterias y otros microorganismos causantes del deterioro del producto, ocasionando la no conformidad de la harina de pescado elaborada (Sepúlveda, 2017).

La *Salmonella* puede causar enfermedad y muertes en los animales, resultando en un mayor coste de producción y una menor rentabilidad de la actividad de crianza (Creus, 2005).

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 (Schlicht, 1997).

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. (Schlicht, 1997).

Los análisis microbiológicos de materias primas usadas en la elaboración de alimentos para animales son importantes para garantizarles a los compradores que estos estén libres de microorganismos contaminantes que puedan afectar los alimentos. Con estos exámenes se puede detectar agentes patógenos, causantes de enfermedad. Allí radica la importancia de los análisis microbiológicos asegurando la calidad de las materias primas evitando que se conviertan en vehículo de enfermedades como la Salmonelosis, entre otras enfermedades de transmisión

alimentaria (Villalobos, 2015).

Existen diversas metodologías para la detección de *Salmonella* spp., la que se usa en el laboratorio de microbiología de NSF LAB es la metodología tradicional ISO 6579 el cual consta de 4 etapas y emite resultado no detectado en 3 días y detectado entre 5 a 6 días.

Así mismo Ruiz et al. (2018) reportan que el método ideal debe tener una alta sensibilidad y especificidad, y ser al mismo tiempo simple, rápido y económico. Ningún método cumple con todos los criterios y es óptimo para todas las condiciones. Es aconsejable apoyarse en los nuevos métodos de diagnóstico que están innovando para el aislamiento de *Salmonella*.

Existe un método alternativo de detección de *Salmonella* spp. VIDAS UP *Salmonella* SPT (validado por AFNORT) el cual es un ensayo de fluorescencia ligada a enzimas (ELFA) que utiliza una tecnología basada en proteínas de fagos recombinantes para usar con los instrumentos automatizados VIDAS o mini-VIDAS, este método emite un resultado negativo entre 24 horas y un resultado positivo entre 3 a 4 días y debe ser verificado antes de su uso.

1.2 Objetivos

- Comparar los resultados de dos metodologías para la detección de *Salmonella* spp. en harina de pescado, los cuales están descritas en la norma ISO 6579 y en el método alternativo VIDAS UP *Salmonella* SPT.
- Evaluar el número de muestras de harina de pescado analizados en el laboratorio de microbiología para detección de *Salmonella* spp. por el método ISO 6579 en los años 2017 a 2021.

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Definiciones generales

- a. **Categoría:** grupo de muestra del mismo origen (ISO16140-1, 2006).
- b. **Cepa diana:** Cepa, definida de acuerdo con el alcance del método de referencia que se espera detectar o enumerar mediante el método alternativo (ISO16140-1, 2016).
- c. **Cepa no diana:** Cepa, definida de acuerdo con el alcance del método de referencia que no se esperaría razonablemente que fuera detectada o enumerada por el método alternativo (ISO16140-1, 2016).
- d. **Concordancia Positiva PA:** El método alternativo cualitativo y el método de referencia presentan un resultado de prueba positivo confirmado (ISO16140-1, 2016).
- e. **DHA:** Ácido docosahexaenoico (Fish, 2018).
- f. **EPA:** Ácido eicosapentaenoico (Fish, 2018).
- g. **Estudio emparejado:** estudio cuando el método de referencia cualitativo y el método alternativo tienen un primer paso común de enriquecimiento (ISO16140-1, 2016).
- h. **Harina de pescado:** Según la norma NTP 204.021.1985 (revisada el 2010) y 204.035.1985 (Revisada el 2010), la harina de pescado es un producto que se elabora a partir de pescado entero o partes de él, se obtiene por reducción del contenido de agua y aceite mediante los procesos de cocinado, prensado y secado. El producto final no tiene ningún material extraño al pescado, salvo un aditivo que permita su conservación. Como producto final está compuesto principalmente por proteínas.
- i. **Inacal:** Organismo público técnico especializado adscrito al ministerio de la producción

- j.** con personería jurídica de derecho público y autonomía administrativa, funcional, técnica, económica y financiera. Es el ente rector y máxima autoridad técnico -normativa del sistema nacional para la calidad (Sanipes, 2016).
- k. Método de detección cualitativo:** es un método que determina la presencia o ausencia de un microorganismo determinado en una cierta cantidad de producto. Para facilitar la recuperación de microorganismos sometidos a stress en los alimentos, las muestras se suelen pre enriquecer en un medio no selectivo seguido de aislamiento y enriquecimiento selectivo en un medio de agar diferencial/selectivo. El uso de dos medios de enriquecimiento diferentes, así como de dos o más medios de agar selectivos, aumenta la sensibilidad del método (UNE en ISO 7218, 2008).
- l. Nivel de seguridad 2:** (riesgo moderado para el individuo, riesgo bajo para la comunidad). Un patógeno que puede causar una enfermedad humana o animal, pero que tiene una baja probabilidad de suponer una amenaza seria para los trabajadores del laboratorio, la comunidad o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede causar una infección humana grave, pero existen medidas preventivas y tratamientos eficaces que hacen que el riesgo de propagación de la infección sea limitado (UNE en ISO 7218, 2008).
- m. Patógeno:** son agentes infecciosos que pueden provocar enfermedades a su huésped. Este término se emplea normalmente para describir microorganismos como los virus, bacterias y hongos, entre otros. Estos agentes pueden perturbar la fisiología normal de plantas, animales y humano (Gut Microbiota for Health , 2012).
- n. Sanipes:** Organismo nacional de sanidad pesquera, es una institución técnica especializada adscrito al ministerio de la producción encargada de normar supervisar y

fiscalizar las actividades de sanidad e inocuidad pesquera, acuícola y de piensos de origen hidrobiológico, en el ámbito nacional, así como en aquellos servicios complementarios vinculados que brinden los agentes.

- o. públicos o privados relacionados con el sector de la pesca, enmarcados en las medidas y normas sanitarias y fitosanitarias internacional (Sanipes, 2016).

2.2 Industria de la harina de pescado en el Perú

Quiroz (2012) reporta que el uso más antiguo de la harina de pescado fue como abono debido a su alto contenido de nitrógeno y fósforo. Con la modernización de la producción poco a poco la fabricación de harina de pescado se ha ido aumentando y se está usando ahora como alimento para animales, debido a su alto contenido proteico.

La industria de harina y aceite de pescado empezó en el norte de Europa a principios del siglo XIX, con procesamiento de Arenque. La primera planta de harina de pescado tipo continuo, fue construida en el año 1891, en Inglaterra (Ramírez, 2014).

En la década de 1910, la industria pesquera se diversificó al comenzar a instalarse fábricas de harina de pescado junto a la fábrica de conservas. La producción de harina de pescado, empleada como abono y comida de aves, pasó de 482 Tm en 1916 a 9000 Tm en 1919. En la década de 1920, la empresa dominante era la Wilbur-Ellis, de gran importancia en el Perú, fundada en San Francisco (Puertas y Maldonado, 2009). En la década de los 30s la harina de pescado fue considerada como un importante ingrediente en alimento para pollos, fue reconocida como un suplemento de proteína animal y como una fuente de vitaminas, minerales y factores desconocidos de crecimiento. En la actualidad se sigue usando por las mismas razones y se conoce con más precisión sus componentes y su valor nutricional en la alimentación animal (Ramírez, 2014).

2.3 Almacenamiento de harina de pescado

La harina de pescado debe ser almacenada en un ambiente limpio, seco y ventilado; en formación de RUMA (1000 sacos de 50 kg cada uno) deben facilitar el acceso, las dimensiones de las rumas son de 1m. de largo, 1.55 m. de ancho y con una altura máxima de 2.80 m., entre rumas debe existir una separación mínima de 1 m., el espacio mínimo para la circulación de vehículos para el transporte de la harina debe ser de 5 m. El control de la temperatura es muy estricto durante los primeros 21 días de almacenaje, la temperatura en el momento de envasado no es mayor a 36 °C y la máxima temperatura permisible posteriormente puede ser 50-40 °C (Quiroz, 2012).

2.4 Productores de harina de pescado

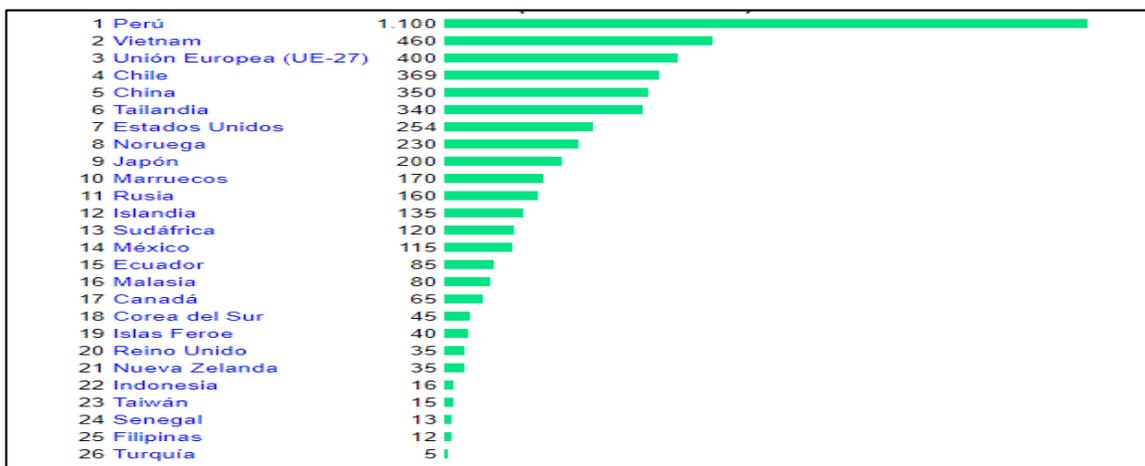
En términos de harina de pescado, Perú, Chile e India continúan siendo los únicos países que reportan una mayor producción acumulada en 2021 con respecto al mismo período en 2020 (Industrias Pesqueras, 2021).

En la Figura 1 se observa que Perú lidera la producción mundial de harina de pescado seguido por Vietnam y Unión Europea.

En el 2021 el Perú fue el primer productor mundial de harina de pescado, seguido de Tailandia, China, Chile y Estados Unidos (Sociedad Nacional de Pesquería, 2021).

Figura 1

Producción de harina de pescado por país en miles de toneladas (TM)



Nota: La producción mundial de harina de pescado en el Perú en el año 2021 fue de 1100 miles de toneladas (TM), tomado de IndexMundi (2022), <https://goo.su/ba6P4>.

En la Figura 2 se observa la variación de producción de harina de pescado desde el año 1964.

Figura 2

Producción de harina de pescado de Perú



Nota: La producción mundial más baja de harina de pescado fue en 1982 y la más alta en 1993, tomado de IndexMundi (2022), <https://goo.su/EVdqM>.

2.5 Mercados de harina de pescado

La harina de pescado compite con otros concentrados de proteína animal y vegetal como las harinas de la industria cárnica y la producción de soya. Sin embargo, estas últimas no ofrecen los amplios beneficios del ingrediente marino en cuestión (Sociedad Nacional de Pesquería, 2022).

La composición de mercados para los productos de Harina de pescado se encuentra principalmente en el continente asiático, siendo China el mayor destino con una participación de 81%. Los principales mercados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Principales mercados de harina de pescado (Miles US\$ FOB)

Mercado	2017	2018	2019	2020	2021	Part % 2021
China	1,177,261	1,257,835	1,119,105	905,523	1,474,195	81.20%
Alemania	17,698	31,418	46,939	48,730	85,130	4.70%
Japón	57,197	75,827	114,419	65,433	71,022	3.90%
Taiwán	41,923	44,529	44,064	32,100	50,964	2.80%
Vietnam	72,572	61,102	65,671	49,850	41,162	2.30%
Ecuador	12,803	27,707	23,944	18,149	25,148	1.40%
Australia	10,022	10,644	9,988	16,582	15,420	0.80%
Corea del Sur	8,563	13,879	7,797	6,594	9,539	0.50%
Hong Kong	2,378	760	1,349	289	7,726	0.40%
Canadá	6,325	2,993	9,443	6,670	7,150	0.40%
Otros	56,587	41,304	71,926	36,228	28,828	1.60%
Total	1,463,329	1,564,997	1,514,645	1,186,148	1,816,284	100%

Nota. Desde el año 2017 China se posiciona como el principal mercado de harina de pescado a nivel mundial. Elaborado en base a Promperú (2021)

2.6 Exportaciones de harina de pescado

En los tres primeros trimestres de 2020, Perú exportó 764 618 toneladas de harina de pescado, lo que supone un descenso del 11 por ciento respecto a 2019. Sin embargo, esta producción se considera un logro dada la situación durante la pandemia. Casi el 80 por ciento de las exportaciones peruanas se destinaron a China, seguida de Japón con una cuota de mercado del 5 por ciento (FAO, 2021).

El 71.9% del volumen total de productos pesqueros exportado en el 2021, corresponde a los envíos de la industria de harina y aceite de pescado y de este total el 60.7% corresponde a la harina de pescado (PromPerú, 2021).

En la Figura 3 se muestra las exportaciones de harina de pescado en los años 2017 hasta el año 2021

Figura 3

Exportaciones de harina de pescado en 2021



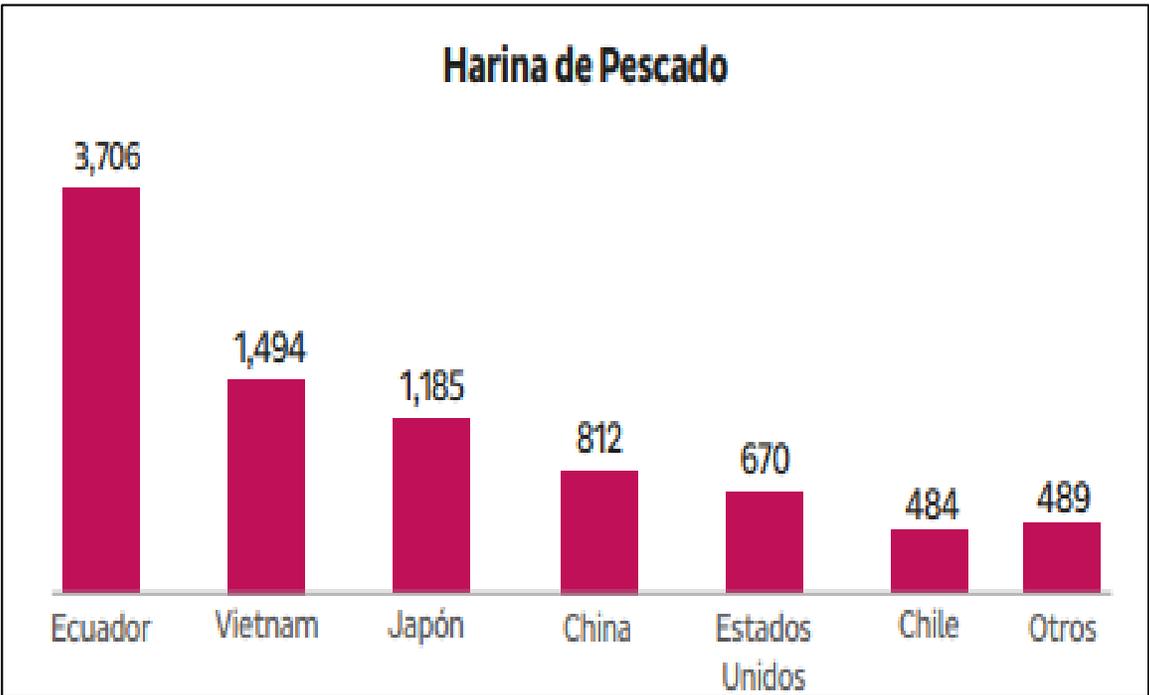
Nota: La línea de harina de pescado experimentó una variación positiva en 53.1% del valor con US\$ 1 816 millones totalizados en el 2021, tomado de PromPerú (2021), <https://goo.su/Rodj>.

El desempeño de las exportaciones pesqueras estuvo determinado por la menor venta externa de harina de pescado, debido a que en noviembre 2020 se exportaba USD 9.2 millones, mientras que para noviembre del presente año se transó el valor de USD 8.8 millones.

Respecto a la exportación de harina de pescado según destino en Noviembre de 2021 (Figura 4), los envíos se colocaron principalmente en Ecuador, representando el 41.9% del valor total exportado, seguido de Vietnam (16.9%), Japón (13.4%), China (9.2%), Estados Unidos (7.6%) y Chile (5.5%), entre los principales. (Produce,2021)

Figura 4

Exportación de Harina de Pescado en miles de US\$ FOB



Nota: Los datos presentados son del mes de noviembre de 2021, tomado de Produce (2021)

<https://bit.ly/3U90zK8>

Las empresas peruanas exportadoras de harina de pescado (Miles US\$ FOB) se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Empresas exportadoras de Harina de pescado

Empresa	2017	2018	2019	2020	2021	Var % 21/20
Tecnológica de Alimentos S.A.	376,856	375,499	348,551	244,862	389,119	58.90%
Pesquera Exalmar	200,343	180,612	193,794	202,094	283,081	40.10%
Corporación Pesquera Inca S.A.C	138,278	232,079	207,959	182,007	255,984	40.60%
Pesquera Diamante S.A.	149,432	170,227	171,759	123,310	216,537	75.60%
Pesquera Hayduk S. A	247,971	172,447	153,312	147,931	188,955	27.70%
Austral Group S.A.A.	118,479	142,479	142,245	81,114	162,035	99.80%
CFG Investment S.A.C.	69,866	115,281	119,643	55,701	109,620	96.80%
Pesquera Centinela S.A.C.	39,104	47,975	54,368	40,575	60,705	49.60%
Pesquera Cantabria S.A.	14,884	27,248	25,532	22,012	40,162	82.50%
Compañía Pesquera Del Pacifico Centro S.A.	26,909	23,107	20,155	20,764	27,814	34.00%
Otros	81,207	81,043	77,328	65,777	82,271	25.10%
Total	1,463,329	1,567,997	1,514,646	1,186,148	1,816,283	53.10%

Nota: La principal empresa exportadora de harina de pescado es Tecnológica de Alimentos S.A.

(TASA), Elaborado en base a PromPerú (2021)

2.7 Importancia de la alimentación animal con harina de pescado

La harina de pescado es un insumo muy valioso en la formulación de alimentos para los animales, Les aporta una gran concentración de proteínas de alta calidad. También aporta ácidos grasos omega-3, DHA y EPA (Fish, 2018).

Gracias a los aminoácidos de las proteínas (especialmente al triptófano, a la lisina o la cisteína) los animales desarrollan mejor su organismo (sobre todo, los tejidos musculares). También se crían más fuertes, ágiles y saludables. Por su parte, las grasas saludables contribuyen a que el animal tenga un mejor estado general de salud. Con beneficios claros sobre la circulación sanguínea y tonificación cardíaca (Fish, 2018).

La harina de pescado es fuente de minerales. Resulta, especialmente, rica en fósforo y también contiene calcio y altos niveles de vitaminas (sobre todo, A, B, B12 y D). Por tanto, constituye un alimento equilibrado y de alto rendimiento energético para los animales (Fish, 2018).

2.8 Información microbiológica de harina de pescado

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. (Quiroz, 2012). Los requisitos microbiológicos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Requisitos microbiológicos para harina de pescado

Categoría	Microorganismo	Plan de muestreo		Límite de control	
		n	c	n	M
Materias primas de origen Hidrobiológico para piensos	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	No detectado en 25 g	
	Enterobacteriaceae	5	2	10 ufc/g	3x10 ² ufc/g

Nota: Se define como piensos a alimentos utilizados para alimentar animales, Elaborado en base a Produce (2021).

En el documento de RM N° 615-2003 se define los componentes del plan de muestreo:

“n”: Número de unidades de muestra requeridas para realizar el análisis, que se eligen separada e independientemente, de acuerdo con normas nacionales o internacionales referidas a

alimentos y bebidas apropiadas para fines microbiológicos.

“c”: Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo de 2 clases o unidades de muestra provisionalmente aceptables en un plan de muestreo de 3 clases. Cuando se detecte un número de unidades de muestra mayor a “c” se rechaza el lote.

“m”: Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable. En general, un valor igual o menor a “m”, representa un producto aceptable y los valores superiores a "m" indican lotes rechazables en un plan de muestreo de 2 clases.

“M”: Los valores de recuentos microbianos superiores a "M" son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud.

Considerando que la harina de pescado es un buen sustrato, rico en proteínas la misma que por su naturaleza es de origen animal, éste tiende a deteriorarse muy fácilmente con ciertos microorganismos los mismos que son aerobios mesófilos, *Clostridium*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Shiguella*, *Salmonella*, siendo los dos últimos los más comunes en su proceso y almacenamiento (Susá, 2011).

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* (FAO, 2002).

2.9 Salmonella

La bacteria *Salmonella* (Figura 5) recibe su nombre por Daniel Elmer Salmon, patólogo veterinario estadounidense; aunque fue su colega y contemporáneo Theobald Smith quien descubrió la bacteria en 1885, aislándola de cerdos infectados de cólera (Navarro, 2017).

Figura 5

Salmonella



Nota: La *Salmonella* pertenece a la familia de enterobacterias. Tomado de Canet (2020)

<https://goo.su/8CmMb>

Es un género de bacterias que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, incluye una larga lista de bacterias gramnegativas, son anaerobias facultativas, es decir utilizan oxígeno si está presente, pero aun en su ausencia pueden crecer, no forman capsulas ni esporas, poseen un aspecto bacilar, de tamaño relativamente grande, suelen ser móviles por estar provistas de flagelos peritricos distribuidos alrededor de una pared celular la cual generalmente no está capsulada, fermentadores de la glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, y no producen ureasa. No tienen metabolismo fermentativo (Sepúlveda, 2017).

2.9.1 Clasificación Taxonómica

Actualmente, gracias a los avances en genética molecular, el encuadre taxonómico de *Salmonella* spp. reconoce dos únicas especies: *S. enterica* y *S. bongori*, considerando *Salmonella bongori* no patógena para el ser humano. *Salmonella entérica*, una de las bacterias de mayor impacto en la salud pública, es un agente productor de zoonosis de distribución universal (Navarro, 2017). La taxonomía de la *Salmonella* se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4*Taxonomía de Salmonella spp.*

Especies	Sub.especies	Serovariedades
1. <i>Salmonella entérica</i>	entérica (I)	1454
	salamae (II)	489
	arizonae (IIIa)	94
	diarizonaea (IIIb)	324
	houtenae (IV)	70
	indica (VI)	12
2. <i>Salmonella bongori</i> (V)	-----	20

Nota: Se asocia a la *salmonella bongori* con animales de sangre fría, Elaborado en base a Rosales, E.; Caicedo, K.; Navas, O.; Castro, H. (s.f.).

2.9.2 Condiciones para crecimiento de *Salmonella spp.*

La temperatura y el tiempo son dos factores claves en el crecimiento de *Salmonella*. Por tanto, los alimentos frescos deben refrigerarse rápidamente para evitar que la bacteria se multiplique (el límite de crecimiento está en 5,2 °C) y contamine los alimentos. Su temperatura óptima de crecimiento es de 35-43 °C (Elika, 2021) (Ver Tabla 5)

Tabla 5*Parámetros de Crecimiento de Salmonella spp.*

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura °C	5,2	35-43	46,2
pH	3,8	7-7,5	9,5
Actividad del Agua	0,93	0,99	>0,99

Nota: En el cuadro se observa que la *Salmonella* puede sobrevivir a un amplio rango de temperatura, Elaborado en base a Elika (2021)

2.9.3 Salmonelosis

La *Salmonella* al ser considerada una bacteria patógena tiene la capacidad nociva de producir infecciones intestinales y/o sistémicas en el hombre y en los animales, enfermedad conocida como "salmonelosis" (Sepúlveda, 2017).

La salmonelosis es una zoonosis, es decir es una enfermedad que puede ser transmitida de los animales a las personas. Numerosas especies animales portan este agente en su intestino, pudiendo o no manifestar la enfermedad y mantenerse como portadores sanos eliminando la bacteria en forma más o menos constante a través de las heces fecales (Insunza y Soto, 1998).

La *Salmonella* es uno de los agentes bacterianos responsable de causar enfermedades, este grupo comprende más de 2000 variedades (serotipos), prácticamente todos los serotipos de *Salmonella* podrían ser capaces de producir una gastroenteritis en las personas (Susá, 2011).

Salmonella es una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas. Los síntomas más comunes de infección por *Salmonella* se desarrollan entre 12 y 72 horas del consumo e incluyen: fiebre, diarrea y calambres abdominales, pero pueden llegar a la muerte en casos de infección severa (Juárez, 2020).

Se sabe que estos microorganismos poseen una marcada especificidad de huésped, por ejemplo: *Salmonella typhi* sólo afecta al hombre; *Salmonella cholerae suis* infecta sólo a porcinos; *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* producen enfermedad principalmente a las aves, particularmente a pollos y gallinas; la *Salmonella dublin* infecta principalmente a bovinos, mientras que *Salmonella abortus ovis* y *Salmonella abortus equi* son infecciosos para ovinos y equinos, respectivamente (Flores, 1981).

2.9.4 Transmisión de Salmonella

Se transmite tanto por contacto directo como por contaminación cruzada durante la

manipulación, y generalmente, su hábitat natural son los intestinos de cualquier tipo de animal homeotermo, incluidos seres humanos (Navarro, 2017). La contaminación cruzada ocurre cuando el microorganismo en un alimento o superficie contaminada entra en contacto con otra superficie y es común que ocurra si el manejador de alimentos no separa alimentos crudos o potencialmente contaminados de aquellos cocidos o utiliza los mismos utensilios, superficies y manos mal sanitizados para el manejo de ambos productos (Juárez, 2020).

Salmonella puede entrar en cualquier punto de la cadena alimentaria, desde las materias primas y los piensos, pasando por la granja, hasta el matadero y los productos cárnicos (Creus, 2005).

En algunos establecimientos las harinas son almacenadas a granel y sin ninguna protección, procedimiento que permite la re contaminación con diversas bacterias y especialmente con *Salmonella*, por medio de insectos, roedores, gorriones, manipuladores, aerosoles; esto explica por qué con gran frecuencia se informa acerca de la contaminación de estos productos y además, se los señala como vehículo de infecciones en los animales y en forma indirecta, como fuente de enfermedades transmitidas por alimentos a humanos (Quiroz, 2012).

El envasado se efectúa generalmente en sacos de polipropileno monoorientado tejido (PP) y es ahí donde se suscita una serie situaciones que puede provocar que el producto se exponga a riesgo de contaminación con esta bacteria (Maza, 1994).

2.9.5 Control de *Salmonella* spp.

Es responsabilidad de los productores de alimentos para humanos y animales garantizar la inocuidad de los productos que comercializan con el fin de evitar retiros de mercado o, en el peor de los escenarios, el brote de alguna enfermedad relacionada con su consumo (Juárez, 2020).

El control de la calidad y seguridad alimentaria de las materias primas que se utilizan o el control

durante el procesado y acabado del producto son esenciales para prevenir microorganismos no deseados, sobre todo patógenos, ya que no solo pueden alterar las características organolépticas y nutricionales de los alimentos, sino que pueden producir infecciones alimentarias, causando enfermedades en el ser humano (Robledo, 2015).

En los últimos años se ha alcanzado un progreso muy avanzado en el diseño de las plantas de harina de pescado, en el flujo de proceso completamente en continuo y cerrado y en el mejoramiento de la tecnología de producción. Numerosas plantas de este tipo están en instalación actualmente en el Perú las cuales prácticamente tiene control sobre la introducción de *Salmonellas* durante el proceso, pero a pesar de todo siempre existen problemas en el almacenamiento, transporte y distribución. Existen muchas industrias que utilizan harina de pescado en la formulación de raciones para alimentar a langostino, peces y mamíferos es práctica común agregar sustancias bactericidas como medida preventiva para evitar desarrollo de *Salmonella* (Maza, 1994).

La industria de la fabricación de piensos, como primer eslabón de la cadena y potencial vehículo de entrada de *Salmonella* en las explotaciones animales, debe asegurar el control de la calidad microbiológica de los piensos. El desarrollo de métodos de análisis más rápidos para detectar y así monitorizar la presencia de *Salmonella* en materias primas y piensos, junto a la aplicación de eficientes tratamientos de descontaminación de los productos, están ayudando a la mejora de la higiene del pienso suministrado en granja (Creus, 2005).

2.9.6 *Salmonella spp. en la industria alimentaria*

Los productos de naturaleza proteica como las harinas de carne-hueso y las harinas de pescado, tradicionalmente se les ha asociado una tasa mayor de contaminación por *Salmonella*. En

diferentes sondeos de ingredientes, y entre ellos el realizado en el año 1993 por la FDA. Se aisló *Salmonella* spp. en el 56,4% de los ingredientes de origen animal (Creus, 2005).

La presencia de *Salmonella* spp. en harina de pescado puede ser consecuencia de la recontaminación proveniente de diversas fuentes, tales como el llenado de sacos y su posterior almacenamiento. El almacenamiento de la harina de pescado representa un riesgo de contaminación (acondicionamiento del suelo, flameado más añadido de cal, colocación de listos de madera) y los espacios de almacenamiento son grandes extensiones al aire libre. (Quiroz, 2012). Uno de los factores más importantes dentro de la calidad de un producto es su inocuidad, no sólo por las repercusiones a la salud de los consumidores, también por las posibles consecuencias económicas, legales y por la pérdida de la imagen pública de la marca (Juárez, 2020).

Para las industrias alimentarias también supone grandes pérdidas económicas ya que el producto contaminado tiene que ser eliminado o bien, exige un aumento de gastos adicionales con el fin de obtener un producto final libre de bacterias patógenas (Robledo, 2015).

Muchos lotes de harina de pescado, carne y huevo, ampliamente utilizados en la elaboración de alimento para animales, pueden contener numerosos serotipos de *Salmonellas* (Flores, 1981).

2.10 Técnicas de detección de *Salmonella* spp.

La determinación de *Salmonella* spp. puede realizarse mediante diferentes métodos. Sin embargo, según la mayor parte de los estudios realizados, el cultivo microbiológico y las pruebas bioquímicas son los procedimientos más comúnmente utilizados para el aislamiento de la bacteria a partir de tejidos y materia fecal. El método ideal debe tener una alta sensibilidad y especificidad, y ser al mismo tiempo simple, rápido y económico. Ningún método cumple con todos los criterios y es óptimo para todas las condiciones, es aconsejable apoyarse en los nuevos

métodos de diagnóstico que están innovando para el aislamiento de *Salmonella* (Ruíz *et al.*, 2018).

Con el fin de prevenir y tratar de manera eficaz esta bacteria, se han ido desarrollando, a lo largo de las últimas décadas, métodos de detección más específicos y rápidos. Además, la necesidad de las empresas de obtener resultados fiables y en menor tiempo ha ido en aumento hasta el día de hoy (Robledo, 2015).

2.11 Medios de cultivo líquidos

Para permitir el crecimiento de microorganismos en el laboratorio, es necesario aportarles un medio con nutrientes y condiciones fisicoquímicas adecuadas para su desarrollo. El medio de cultivo es aquel que contiene agua y una serie de nutrientes, necesarios para su metabolismo. Normalmente se utilizan placas de Petri con agar más nutrientes específicos (según el microorganismo que se desea aislar), aunque también existen medios de cultivo en tubo (Zevallos, 2018).

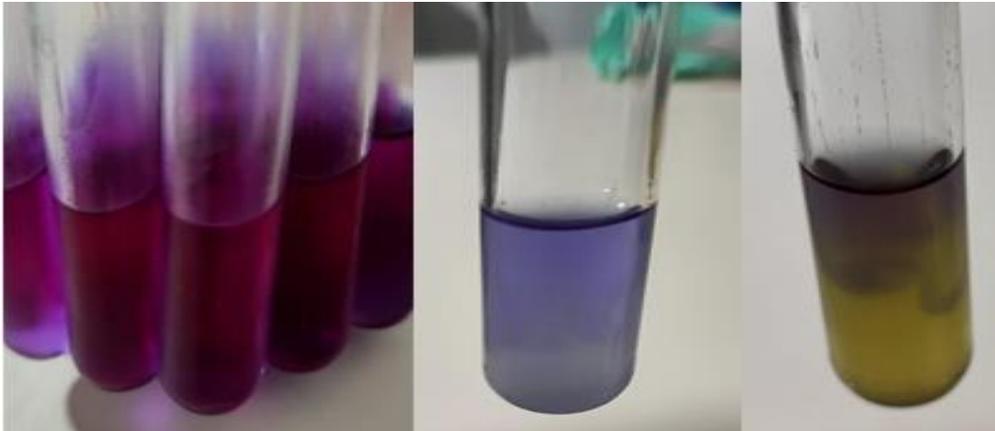
Los medios de cultivo líquidos no contienen ningún agente gelificante, por lo que los microorganismos crecen por todo el medio. El crecimiento en este tipo de medios es más rápido puesto que la movilidad permite acceder de una forma más fácil a los nutrientes (Zevallos, 2018).

- **BPW:** Se emplea como como caldo de enriquecimiento no selectivo. El pre-enriquecimiento con este caldo da mayores crecimientos principalmente de Enterobacteriaceae patógenas (*Salmonella*), ya que revitaliza aquellas especies dañadas en determinados procesos industriales. Es característico el pre-enriquecimiento en muestras de alimentos donde se debe detectar *Salmonella* (Cultimed, s.f.).

- **Caldo lisina descarboxilasa (LIA):** Se emplea para la identificación y diferenciación de bacilos entéricos con capacidad de descarboxilar aminoácidos, en este caso la L-Lisina. Cuando se procede al cultivo, todas las Enterobacteriáceas fermentarán la Glucosa y el pH del medio bajará. A partir de aquí, si son capaces de descarboxilar la L-Lisina, volverá a subir el pH del medio, por lo que el Púrpura de Bromocresol recupera el color púrpura. Los tubos positivos tomarán un color púrpura o violeta (Figura 6) mientras que los tubos negativos serán amarillos (Cultimed, s.f.).

Figura 6

Reacción bioquímica de lisina descarboxilasa



Nota: En la figura se observa un medio sin inocular un medio con reacción positiva y un medio con reacción negativa.

- **Caldo MKTTn:** es un medio clásico para el enriquecimiento de patógenos intestinales, sobre todo los miembros de género *Salmonella*, a partir de materiales muy contaminados con otras bacterias, como heces, orina, aguas fecales, etc. Durante la preparación, al añadir el yodo al medio de cultivo se forma tetrionato a partir del sulfato y esta sal, junto con las sales biliares provoca una fuerte inhibición de la mayoría de las bacterias intestinales, excepto aquellas capaces de reducir el tetrionato, como las *Salmonellas* (Avantor, 2022).

- **Caldo Rappaport Vassiliadis (RVS)** Medio utilizado para enriquecimiento selectivo de especies de *Salmonella* spp. (excepto *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*. Es un medio de cultivo nutritivo que contiene un sistema buffer de fosfatos, alta concentración de sales de magnesio y sodio y la presencia del colorante verde de malaquita (oxalato) (Britania, 2021).

2.12 Medios de cultivo Sólidos

Tienen una proporción de agar de aproximadamente el 1,5%. El crecimiento se desarrolla en la superficie del medio. Estos medios pueden depositarse en placas de Petri o en tubos de ensayo (Zevallos, 2018).

- **Agar Verde brillante:** es un potente inhibidor de la flora Grampositiva. Este medio (Figura 7) está indicado para el desarrollo de las especies de *Salmonella* a excepción de *Salmonella typhi*. Las colonias típicas de *Salmonella* aparecen de color rosado con un halo rojo alrededor (Cultimed, s.f.).

Figura 7

Colonias de Salmonella en Agar Verde Brillante



Nota: Las colonias típicas de *Salmonella* spp cambia el medio verde brillante a color rojo.

- **XLD (Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato):** Es un medio moderadamente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y la diferenciación de patógenos entéricos gram negativos (*Salmonella* y *Shigella*) (Becton Dickinson, 2013).

El Sodio Desoxicolato (Figura 8) inhibe el crecimiento de la flora contaminante Grampositiva. Por la presencia de Sodio Tiosulfato y Amonio Hierro (III) Citrato las bacterias productoras de hidrógeno sulfuro dan colonias ennegrecidas siempre y cuando el pH del medio se mantenga alto (Cultimed, s.f.).

Figura 8

Colonias de Salmonella en Agar XLD



Nota: las colonias típicas de *Salmonella* son de color rojo con el centro negro debido a la producción de H₂S

- **Agar TSI (triple azúcar hierro):** es usado para la diferenciación de bacilos gram negativos entéricos basado en la fermentación de carbohidratos (sacarosa, lactosa y dextrosa) y la producción de ácido sulfhídrico. Contiene tres azúcares: dextrosa, lactosa y sacarosa; rojo de fenol para detectar la fermentación de estos carbohidratos, y sulfato ferroso para detectar la producción de ácido sulfhídrico. La degradación o fermentación

del azúcar con formación de ácido se manifiesta por un cambio de color del indicador Rojo de fenol que vira de anaranjado-rojizo a amarillo, o por un viraje a rojo intenso en caso de alcalinización. El tiosulfato es reducido por algunos gérmenes a ácido sulfhídrico, el cual reacciona con la sal férrica produciendo sulfuro de hierro de color negro (Ver Figura 9) (Delgado, 2020).

Figura 9

Salmonella typhimurium ATCC14028 en Agar TSI



Nota: El agar TSI se utiliza para la confirmación de Enterobacterias gran negativos.

- **Agar Urea** es usada en la preparación de medios para la diferenciación de microorganismos, especialmente las Enterobacterias con base a la producción de ureasa (Delgado, 2020). Tiene componentes nutritivos y energéticos, lo que permite un

crecimiento más diversificado de microorganismos y una detección más amplia de ureasa positivos. A su vez el Sodio Cloruro aporta la salinidad necesaria para el buen desarrollo de los microorganismos. En el proceso de degradación de la urea se produce amoníaco, éste hace variar el color del indicador Rojo de Fenol (de amarillo a rojo) (Figura 10) poniéndose así de manifiesto la actividad ureasa. (Cultimed, s.f.).

Figura 10

Reacción positiva de agar urea de Christensen



Nota: El medio de cultivo inicial es de color amarillo, en una reacción negativa el medio de cultivo permanece amarillo.

2.13 Métodos para detección de Salmonella

2.13.1 Normalizados

Son métodos desarrollados por un organismo de normalización o por otras organizaciones bien establecidas, cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico en cuestión. Estos

métodos normalizados son considerados como de referencia, ya que pueden ser utilizados para evaluar otros métodos desarrollados para la misma determinación. No requieren una validación completa, pero sí la confirmación de su correcta aplicación. Se trata de métodos que el laboratorio aplica como ya está descrito en las normas (Correa, 2018).

2.13.2 No normalizados

Métodos no estandarizados o desarrollados por los laboratorios o por terceros, o que son adaptados para el laboratorio a partir de un método normalizado y validado (Correa, 2018).

2.14 Normas ISO

Las normas ISO son un conjunto de reglamentos y disposiciones de aplicación universal, que se proponen garantizar condiciones mínimas de calidad, tiempos de entrega y niveles de servicio en diferentes tipos de empresas y organizaciones.

Estas normas son aplicables a diferentes tipos de organizaciones, y les otorgan un conjunto de certificaciones si cumplen con los niveles de exigencia establecidos en dichas normas. Existen entidades de certificación que definen el cumplimiento o no de las normas ISO, realizan auditorías para brindar el certificado correspondiente o hacer exigencias previas a su otorgamiento (Editorial Etecé, 2020).

2.14.1 Método ISO 6579:2017

La Norma ISO 6579 constituye un método analítico de tipo cualitativo, dado que la respuesta del análisis será la presencia o ausencia del microorganismo, detectado de forma directa o indirecta, en una cierta cantidad de muestra (Freschi *et al.*, 2018).

Según el método ISO 6579:2017 AMD 1:2020 la detección se realiza en 4 etapas:

2.14.1.1 *Pre-enriquecimiento.*

Se inocula agua con peptona tamponada (BPW) a temperatura ambiente con la porción de prueba, luego se incuba entre 34 °C y 38 °C durante 18 h.

2.14.1.2 *Enriquecimiento selectivo.*

El caldo RVS o el agar MSR/V se incuba a 41,5 °C por 24 h y el caldo MKTTn entre 34 °C y 38 °C por 24 h.

2.14.1.3 *Siembra en medios sólidos selectivos*

- Agar xilosa lisina desoxicolato (agar XLD);
- Cualquier otro medio sólido selectivo complementario del agar XLD.

El agar XLD se incuba entre 34 °C y 38 °C y se examina después de 24 h. El segundo agar selectivo se incuba según las instrucciones del fabricante.

2.14.1.4 *Confirmación.*

Seleccionar al menos una colonia típica o sospechosa para la confirmación. Si ésta resulta negativa, seleccionar hasta 4 colonias sospechosas, asegurando que dichas colonias provengan de diferentes combinaciones de los medios de enriquecimiento y agares selectivos. Marcar las colonias sospechosas seleccionadas en cada placa. Estriar las colonias seleccionadas en la superficie de placas de agar nutritivo secadas, de manera que se permita el desarrollo de colonias aisladas. Incubar las placas inoculadas a (34 °C a 38 °C) por 24 ± 3 horas.

Si se dispone de colonias bien aisladas (cultivo puro) desde las placas de agar selectivo, la confirmación bioquímica se puede realizar tomando directamente una colonia sospechosa bien aislada. Inocular cada una de las colonias seleccionadas en los medios TSI, LIA (o LDC), Agar Urea e incubar entre 34 °C a 38 °C por 24 ± 3 horas.

2.14.1.5 Prueba serológica.

Las colonias puras que muestran reacciones bioquímicas típicas para Salmonella se analizan para detectar la presencia de antígenos O y H de Salmonella.

2.14.2 ISO 16140-3

Este método especifica diferentes procedimientos de validación de métodos alternativos utilizados en la microbiología de la cadena alimentaria. Estos métodos suelen ser más rápidos, baratos y fáciles de utilizar que los métodos normalizados correspondientes, aunque igualmente eficaces para determinados propósitos. Pero, para obtener resultados fiables con un método específico y poder comparar los resultados obtenidos con el mismo método en diferentes laboratorios, es necesario que los métodos estén validados con un protocolo común. Este documento especifica el protocolo para la verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados para su implementación en el laboratorio usuario (Higiene Ambiental, 2021).

2.15 Validación de método

Establecimiento de las características de desempeño de un método y provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos de desempeño para un uso específico previsto (ISO16140-1, 2016).

Hoy en día, existen muchos métodos alternativos, en su mayoría patentados, que se utilizan para evaluar la calidad microbiológica de las materias primas y los productos terminados y el estado microbiológico de los procedimientos de fabricación. Estos métodos suelen ser más rápidos y fáciles de realizar que el método estandarizado correspondiente. Los desarrolladores, los usuarios finales y las autoridades necesitan un protocolo común confiable para la validación de

tales métodos alternativos. Los datos generados también proporcionarán a los usuarios finales potenciales datos de rendimiento para un método determinado, lo que les permitirá tomar una decisión informada sobre la adopción de un método en particular. Los datos generados también pueden ser la base para la certificación de un método por parte de una organización independiente (ISO 16140-2, 2016).

2.16 Verificación

Demostración de que un método validado funciona, en manos del usuario, de acuerdo con las especificaciones del método determinadas en el estudio de validación y es adecuado para un uso específico previsto (ISO 16140, 2003).

El laboratorio debe verificar que puede llevar a cabo apropiadamente los métodos antes de utilizarlos, asegurando que se pueda lograr el desempeño requerido. Se deben conservar registros de la verificación. Si el método es modificado por el organismo que lo publicó, la verificación se debe repetir, en la extensión necesaria (ISO 17025).

Con una verificación se busca comprobar que un laboratorio es capaz de cumplir con las exigencias de ejecución del método en condiciones habituales de trabajo, es decir, sometido a variantes tales como los analistas, matrices, insumos, equipos, entre otras. La verificación se realiza en métodos que ya cuentan con una validación previa, por parte de una de las organizaciones internacionales especializadas en esta materia, como lo son la AFNOR (Association Française de Normalisation) (Riquelme, 2015).

2.16.1 *Protocolo para la verificación de métodos*

(ISO 16140-3, 2021) menciona 3 protocolos e indica que la elección del protocolo depende de la capacidad del laboratorio para lograr el nivel deseado de contaminación de la porción de prueba. Se pueden utilizar cultivos de laboratorio o materiales de referencia para la inoculación.

- **Protocolo 1** se puede usar cuando no se está seguro de lograr el nivel deseado de contaminación de las porciones de prueba. Esto es relevante cuando se utiliza un cultivo, sin conocimiento previo del nivel real del inóculo, para inocular las porciones de prueba.
- **Protocolo 3** se puede utilizar cuando se conoce el nivel de contaminación del inóculo, por ejemplo, cuando se utiliza un material de referencia con concentración conocida. El nivel de contaminación para el protocolo 3, es de 3 ufc a 5 ufc
- **Protocolo 2** se puede utilizar si el primer protocolo elegido no funcionó como se esperaba y es necesario repetir el experimento.

2.16.2 Parámetros para la verificación de un método

a. Inclusividad

El estudio de inclusividad involucra cepas diana puras para ser detectadas o enumeradas por el método alternativo (ISO16140-1, 2016).

b. Exclusividad

El estudio de exclusividad involucra cepas no objetivo puras, que pueden ser potencialmente reactivas, pero no se espera que sean detectadas o enumeradas por el método alternativo (ISO16140-1, 2016).

c. Sensibilidad

Fracción del número total de cultivos o colonias positivos que son correctamente asignados con el método utilizado. También puede definirse como la capacidad de un método de detectar el microorganismo diana, cuando éste está presente (Freschi *et al.*, 2018).

d. Especificidad

Fracción del número total de cultivos o colonias negativos que son asignados correctamente con el método utilizado. También puede definirse como la capacidad de un método de no detectar el microorganismo diana, si éste no está presente (Freschi *et al.*, 2018).

e. Límite de aceptabilidad

Diferencia máxima positiva o negativa aceptable entre el valor de referencia de una muestra y un resultado individual obtenido al aplicar el procedimiento operativo de un método analítico (ISO16140-1, 2016). Para el protocolo 3, deberá haber un mínimo de seis resultados positivos de las siete réplicas analizadas (ISO16140-3, 2021).

2.17 Método alternativo VIDAS UP *Salmonella* spp. (SPT)

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

El método alternativo, VIDAS UP *Salmonella*, cuenta con un certificado de validación emitido por AFNOR, de acuerdo con lo establecido en la norma ISO 16140-2:2016.

2.17.1 Componentes

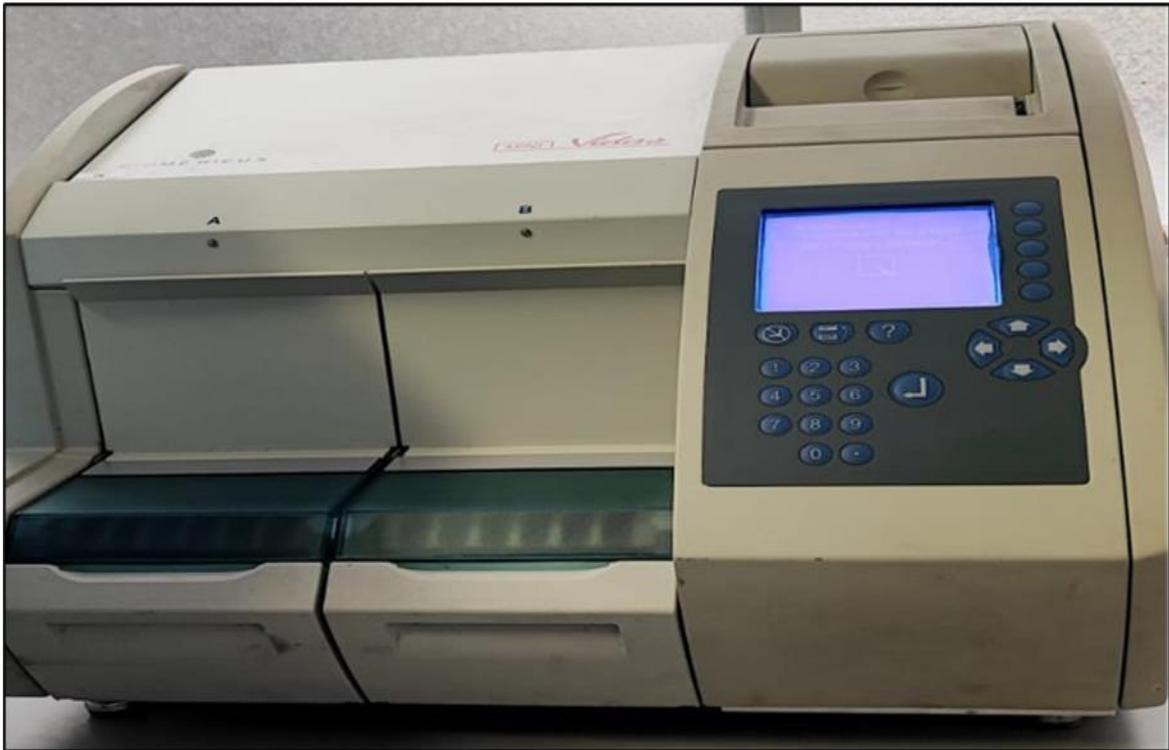
2.17.1.1 Equipo VIDAS.

En la Figura 11 se observa el equipo vidas el cual es un sistema automático multiparamétrico de inmunoanálisis basado en los principios de la tecnología ELFA (Combinación del método ELISA con una lectura final por fluorescencia). Sistema rápido y trazable de detección de patógenos alimentarios que es robusto, confiable e incluye una amplia variedad de pruebas para contaminantes comunes. Totalmente automatizado desde la inserción de la muestra hasta los resultados, el módulo analítico puede realizar automáticamente hasta 12 pruebas por hora.

Computador integrado con botones de control, sitio de carga de SPR, impresora térmica integrada Lector de código de barras, sitio de carga de tiras de reactivos, luces LED indicadoras (SIMED, 2022).

Figura 11

Resultados de Inclusividad y exclusividad para la detección de Salmonella



Nota: *Este equipo tiene la capacidad para dar resultados en simultaneo de 12 muestras.*

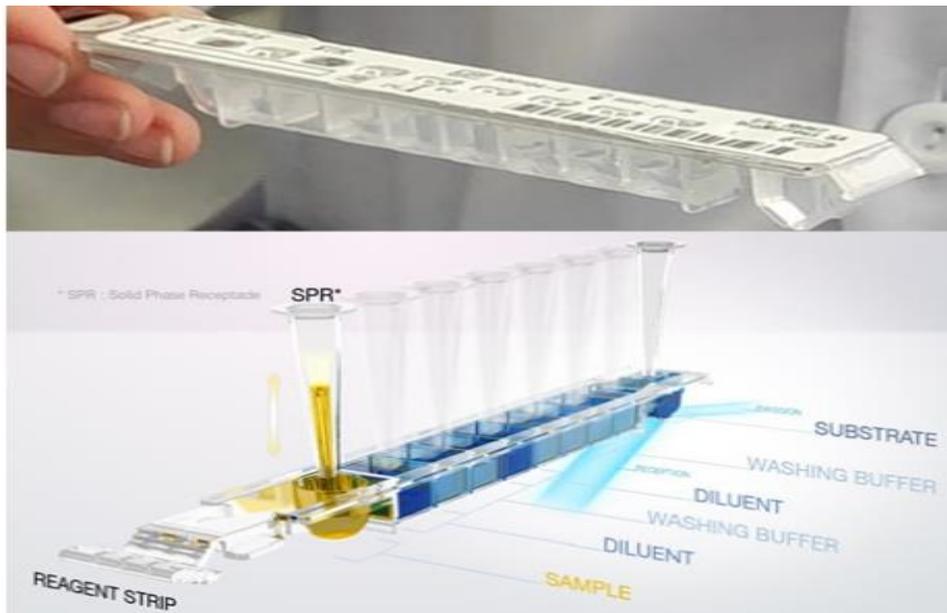
Este equipo contiene un kid que consta de lo siguiente:

- **Cono (SPR recipiente de fase sólida):** sirve a la vez de fase sólida y de dispositivo de pipeteo. El interior del SPR está recubierto de proteínas específicas para los antígenos de *Salmonella spp*

- **Tira:** contiene todos los reactivos necesarios listos para usar para la prueba (solución de lavado, proteínas específicas anti-*Salmonella* conjugadas con fosfatasa alcalina y sustrato) (Ver Figura 12).

Figura 12

Tira que contiene reactivos



Nota: en el primer pocillo de la tira se inocula 0.5 ml de muestra a analizar. Tomado de SIMED (2022)

Está compuesto por 10 pocillos cubiertos por una hoja de aluminio sellada y etiquetada. La etiqueta contiene un código de barras donde se indica el código del ensayo, el número de lote del kit y la fecha de caducidad. La hoja de aluminio del primer pocillo está perforada para facilitar la introducción de la muestra. El último pocillo es una cubeta donde se realiza la lectura fluorométrica. Los diferentes reactivos necesarios para el ensayo están en los pocillos intermedios

- **Suplemento Salmonella**

El Suplemento *Salmonella* y los reactivos *Salmonella* SUP TAB, combinados con Agua de Peptona Tamponada, sirven para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella*. La mezcla selectiva inhibe la mayoría de las bacterias grampositivas y algunas gramnegativas.

El frasco (Figura 14) que contiene el suplemento liofilizado debe reconstituirse con 14 ml de una solución de etanol al 70 % y se puede almacenar durante 10 horas a 18- 25 °C o 7 días a 2- 8 °C. Una vez reconstituida se debe homogeneizar el frasco que contiene el suplemento.

Figura 13

Suplemento para Salmonella spp.



Nota: Se usa un frasco de Suplemento *Salmonella* para 14 muestras.

2.17.1.2 Equipo heat&go.

Basado en un sistema de calefacción en seco que proporciona una fuente de temperatura constante. Su función consiste en calentar las muestras contenidas en las tiras de Vidas para mejorar la sensibilidad de los ensayos, proceso denominado “terminación” (Ver Figura 13).

Figura 14

Equipo heat&go



Nota: La temperatura de este equipo sube automáticamente a 131.0 °C

2.17.2 Principio

Cada pocillo tiene anticuerpos específicos para un microorganismo concreto fijados a su superficie.

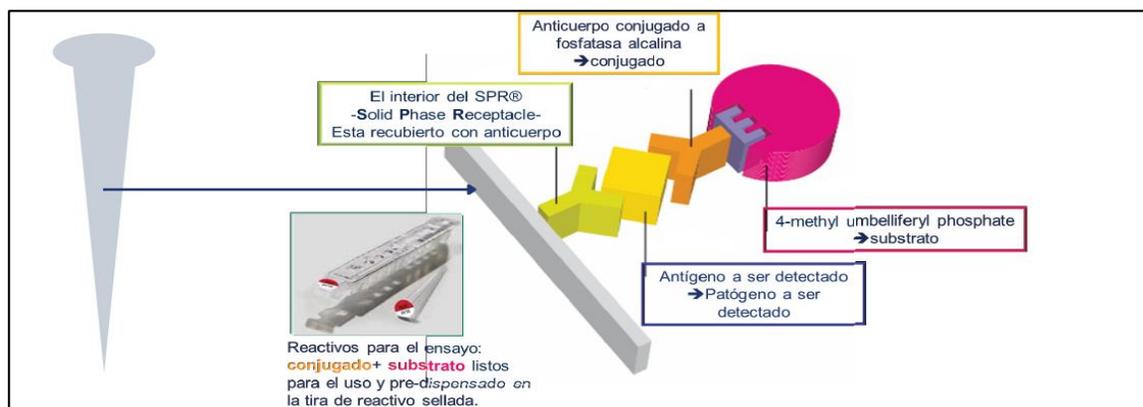
Pasos:

- Se añade al pocillo la muestra que contendrá los antígenos correspondientes. Una vez fijado el antígeno se realiza un lavado para eliminar cualquier sustancia interferente.
- El equipo añade anticuerpos ligados a fosfatasa alcalina, que se une al antígeno. De nuevo se produce un lavado que retira todo lo que no sea complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo-fosfatasa del medio de reacción.
- A continuación, se añade 4-metil-umbeliferil-fosfato al medio de reacción, que actúa de sustrato para la fosfatasa alcalina.

- La fosfatasa alcalina hidroliza el enlace del umbeliferil con el fosfato, produciendo 4-metil-umbeliferona, una molécula fluorescente, que emite a 450 nm. Esta fluorescencia es detectada por el aparato, cuantificando la cantidad de antígeno.

Figura 15

Sistema y tecnología ELFA



Nota: La detección de *salmonella spp* consiste en un inmunoensayo combinado con captura específica mediante fagos y detección con tecnología ELFA. Tomado de SIMED (2022)

Al final de la prueba, los resultados son analizados automáticamente por el sistema, que da un valor de prueba (TV) para cada muestra. Este valor se compara con una referencia interna (umbral) y se interpreta cada resultado (positivo, negativo) de acuerdo con la Tabla 6.

Tabla 6

Resultado de VIDA UP Salmonella SPT

Test Value TV	Interpretación
<0.25	Negativo
≥0.25	Positivo

Nota: Los resultados obtenidos en base a esta interpretación han sido confirmado por metodología tradicional

2.18 Cepas microbiológicas ATCC

Son un conjunto de especies de bacterias que comparten al menos una característica. Son usadas en el laboratorio de microbiología para controlar diferentes procedimientos. Las cepas microbiológicas ATCC son una de las más usadas. Este grupo de material biológico de referencia certificado, son conocidos como American Type Culture Collection (ATCC) y son útiles para evaluar la calidad de los medios de cultivo usados en los procedimientos en el laboratorio de microbiología, asegurar la calidad de los resultados de ensayos de laboratorio microbiológico y para validar métodos microbiológicos usados dentro del laboratorio (MDM científica, 2019).

III DESARROLLO DEL TRABAJO

3.1 Ejecución del trabajo

El trabajo se llevó a cabo durante el año 2021, el análisis de las muestras de harina de pescado se realizó en las instalaciones del laboratorio de microbiología de NSF PERU LAB que es una organización de inocuidad y salud pública independiente a nivel mundial, desarrolla estándares, analiza y certifica productos para diversas industrias y está compuesto por tres segmentos: análisis técnicos, laboratorio y desinfección.

En el sector de laboratorio se encuentra el área de microbiología donde se trabaja bajo la norma ISO/IEC 17025 y está acreditado por INACAL Y SANIPES.

3.2 Experiencia profesional en microbiología

Como analista microbiólogo de la empresa NSF PERU LAB una de las funciones a realizar es analizar microorganismos como *Salmonella* spp. en harina de pescado por diferentes metodologías, y para poder llevar a cabo esta función he tenido que basarme en lo aprendido en los cursos de la facultad de pesquería de la universidad Nacional Agraria La Molina específicamente en el curso de microbiología pesquera, sistema de calidad pesquera y procesamiento de harina de pescado.

La experiencia adquirida en NSF PERU LAB desde el año 2017 hasta la actualidad me da la capacidad de ser un profesional dinámico, con criterio, integral, con facilidad para llevar el control y aseguramiento de la calidad de los servicios brindados, trabajando estrictamente bajo las normas establecidas por las entidades reguladoras y por las normas internacionales.

Debido a los conocimientos adquiridos y a evaluación de los resultados emitidos de muestras

de harinas de pescado analizadas para detección de *Salmonella* en el laboratorio en el periodo 2017-2021 se propuso optar por utilizar un método alternativo como VIDAS UP *Salmonella* SPT para la detección de *Salmonella* spp. en harina de pescado en el laboratorio de microbiología de NSF LAB PERU beneficiando de esta manera en la entrega de resultados a 24 horas para el cliente y mejorando el tiempo invertido por cada analista en la detección de este patógeno ya que se usa un equipo automatizado. Para poder utilizar este método se verifico antes de su uso porque el método fue validado por AFNORT para la categoría alimento para animales.

3.3 Condiciones de trabajo

- a. La manipulación de los microorganismos se realizó en un ambiente de trabajo destinada para harinas de pescado (ambiente IV) el cual es cerrado y cuenta con lámparas ultravioletas para su desinfección.
- b. El ambiente de trabajo cuenta con condiciones ambientales controladas (temperatura y humedad relativa) que son adecuados para las actividades del laboratorio.
- c. Para la manipulación de los microorganismos se utilizó la indumentaria adecuada (mandil, indumentaria descartable, cubre cabello, cubre calzado, mascarillas, lentes protectores).
- d. En la mesa de trabajo se cuenta con desinfectante como alcohol al 70% para desinfectar la mesa de trabajo, tejo al 1% para descartar pipetas y material contaminado con cepas.
- e. Todo material usado fue descontaminado según los procedimientos internos del laboratorio, para el material con cepas se realizó un tratamiento térmico en autoclave a 121 °C por 30 minutos.
- f. Se trabajó bajo el nivel de seguridad 2.

3.4 Documentos de referencia

- NTP-ISO/IEC 17025: 2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- UNE en ISO 7218 (2008). Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal requisitos generales y el examen microbiológico.
- ISO 6579:2017 AMD: 2020. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- VIDAS UP *Salmonella* (VIDAS SPT Ref.30707) (Certificate number: BIO 12/32 - 10/11) for the detection of *Salmonella* spp. in a broad range of foods, feed, pet food, production environmental samples and primary production samples
- ISO 16140-1,2016 Microbiology of the food chain-Method validation-Part 1: Vocabulary
- ISO 16140-2,2016 Microbiology of the food chain-Method validation-Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory.
- ISO 16140-3,2021 Microbiology of the food chain -Method validation -Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory.
- IL01 – 8.1. “Instructivo para la estandarización de suspensiones microbianas para el aseguramiento de calidad de los ensayos microbiológicos.

3.5 Métodos utilizados

3.5.1 Método de referencia

ISO 6579 - 1 First edition 2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Parte 1: Detection of *Salmonella* spp. (Excepto item 9.3.3; 9.4.3, Annex D).

3.5.2 Método alternativo

Método VIDAS UP *Salmonella* SPT (VIDASSPT Ref.30707) (Certificate number: BIO 12/32 - 10/11) for the detection of *Salmonella* spp. in a broad range of foods, feed, pet food, production environmental samples and primary production samples.

3.6 Muestras de trabajo

Se utilizaron muestras de harina de pescado las cuales fueron analizadas para determinación de *Salmonella* spp. con el método ISO 6579-2017 AMD 2020 y se seleccionaron las muestras libres del patógeno *Salmonella* spp. en 25 g (Ver Figura 16).

Figura 16

Harina de pescado



3.7 Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas fueron las siguientes (Figura 17):

- *Salmonella enterica* ATCC 14028
- *Salmonella enterica* ATCC 10708
- *Salmonella enterica* ATCC 13070
- *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
- *Enterobacter cloacae* ATCC 13047
- *Proteus mirabilis* ATCC 29906
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Escherichia coli* ATCC 25922

Figura 17

Cepas microbiológicas



Nota: Mediante lectura de la absorbancia de cada cepa se puede determinar la cantidad de ufc/ml que contiene cada una.

De acuerdo con el instructivo interno IL01 – 8.1. “Instructivo para la estandarización de suspensiones microbianas para el aseguramiento de calidad de los ensayos microbiológicos”, las características de las cepas usadas (Tabla 7) son:

Tabla 7

Absorbancia y Recuento de suspensiones

Microorganismo	ATCC	Absorbancia a 450 nm	Recuento ufc/ml
<i>Escherichia coli</i>	25922	0.749(0.741-0.749)	45(40-49)
<i>Salmonella enteritidis</i> <i>tiphyrium</i>	14028	0.585(0.578-0.591)	35(31-38)
<i>Salmonella enteritidis</i> <i>choleraesuis</i>	10708	0.569 (0.562 - 0.576)	33 (29-36)
<i>Escherichia coli</i>	8739	0.69 (0.673 - 0.707)	44 (39-49)
<i>Proteus mirabilis</i>	29906	0.672 (0.652 - 0.681)	48 (44 - 50)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	0.738 (0.728 - 0.747)	45 (40-50)
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	0.536 (0.530 - 0.541)	24 (20-28)

Nota: El recuento de absorbancia descrito en esta tabla permitió obtener el recuento de interés para este trabajo. Tomado de ILI-8.1 (2018)

3.8 Equipos utilizados para determinación de *Salmonella*

- Autoclave 121°C ± 1 °C 115 °C ± 1 °C
- Incubadora a 36 °C ± 1 °C
- Incubadora 41,5 °C ± 1 °C
- Refrigerador a 5 °C ± 3 °C.
- Lector ELISA

- Asas estériles, de diámetro 3 mm (10 µl de volumen)
- Asa en punta.
- pH-metro con precisión de calibración de $\pm 0,1$ unidad de pH a 20 °C a 25 °C.
- Tubos estériles
- Pipetas graduadas estériles 1, 5,10 ml
- Placas Petri estériles con diámetro de 90 mm
- Microplacas
- Balanza digital.
- Sistema automatizado Mini VIDAS
- Bloque calefactor VIDAS (Heat&go)
- Vórtex.
- Stomacher.
- Placas de vidrio para aglutinación.
- Tubos de ensayo.
- Bolsas con filtro estériles para stomacher.
- Mechero
- Pinzas y tijeras de acero inoxidable
- Pipetas y puntas estériles

3.9 Medios de cultivo y reactivos

- Agua desionizada
- Agua de peptona Bufferada (BPW)
- Medio RVS (Rappaport-Vassiliadis)
- Medio MKTTn (Muller-Kauffmann con Verde Brillante y Novobiocina)

- Alcohol de 70°
- Kit VIDAS UP *Salmonella*
- Agar en placa, desoxicolato (XLD), Verde Brillante (VB), Agar Nutritivo.
- Agar en tubo TSI, Agar Urea de Christensen,
- Caldo lisina descarboxilasa
- Suero fisiológico
- Antisuero *Salmonella* spp. (O, H)
- Suero fisiológico

3.10 Preparación de suspensión inicial

Para el método tradicional ISO 6579 se pesó 25 g de harina de pescado con 225 ml de BPW, para el método alternativo se procedió de la misma forma, pero se utilizó bolsas con filtro.

3.11 Preparación de suspensión de cepa

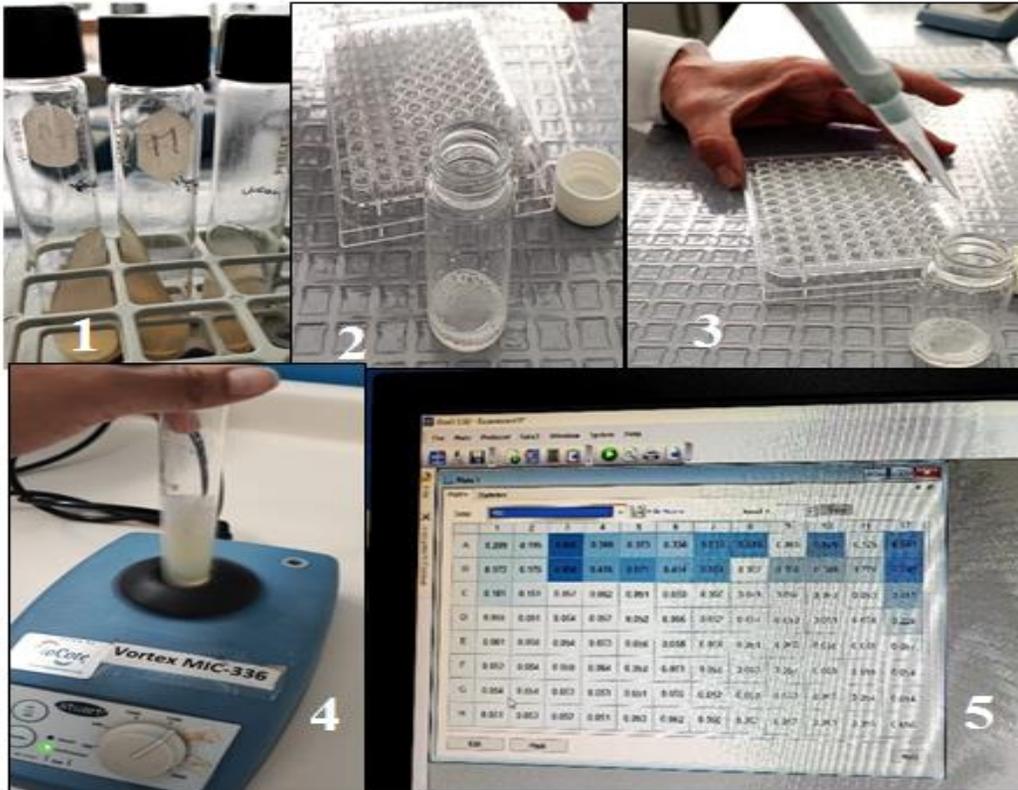
Para la preparación de la suspensión se utilizó como referencia el instructivo de NSF LAB IL01 – 8.1. “Instructivo para la estandarización de suspensiones microbianas para el aseguramiento de calidad de los ensayos microbiológicos”.

1. Se estrió el microorganismo de trabajo en agar TSA en tubo y se incubó a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas,
2. Pasado el tiempo de incubación el tubo de agar TSA con crecimiento del microorganismo se lavó con 3 ml de buffer fosfato a pH 7.2
3. Se filtró la suspensión con jeringa que contiene gasa estéril y se homogenizo en vortex por 30 segundos.
4. Se puso una alícuota de 100 μ L de la suspensión en 03 pocillos de una microplaca.

5. se realizó la lectura de absorbancia a 450 nm en el lector de ELISA arrojando las lecturas de absorbancia en un programa (Anexo 1) y estos resultados de absorbancia fueron reportados en la Tabla 8.

Figura 18

Preparación de suspensión de cepa



Nota: Se realizo la preparación de la suspensión según el documento interno perteneciente al laboratorio de microbiología.

Tabla 8

Lectura de absorbancia de Salmonella enteritidis tiphymurium

	Repeticiones			Promedio
	1	2	3	
Lectura de absorbancia a 450 nm	0.581	0.588	0.587	0.585

Nota: Se realizó las lecturas de absorbancia por triplicado.

Para obtener los recuentos aproximados se realizó por duplicado 4 diluciones consecutivas (Ver Anexo 2) de 100 µl de la suspensión inicial (con absorbancia 0.585) en tubos con 9.9 ml de buffer hasta obtener una dilución 10^1 a la cual se denominará tubo 4 y a partir de ahí se inoculo 1ml del tubo 4 con 9 ml de buffer para obtener una dilución 10^{-1} a la cual se denominará tubo 5.

Diluciones:

- $10^9, 10^7, 10^5, 10^3, 10^1$ (tubo 4)
- 10^{-1} (tubo 5)

Al sembrar por duplicado la suspensión de cepa inicial se obtuvo 2 tubos 4 y de cada tubo se incorporó en 3 placas Petri 1ml de suspensión de cepa y 1ml de suspensión del tubo 5, se añadió 20 ml de agar TSA a cada placa y se dejó solidificar, se incubo por 24 horas a 35 ± 1 °C, en teoría se esperó obtener 35 ufc/ml de colonias de *Salmonella enteritidis tiphymurium* del tubo 4 y 3 ufc/ml de colonias de *Salmonella enteritidis tiphymurium* del tubo 5, los resultados reales obtenidos se muestran en la Tabla 14.

3.12 Verificación del método alternativo

Para verificar el método alternativo se añadió 1 ml de suplemento *Salmonella* a la suspensión inicial y se añadió 1.5 ml de la suspensión inicial de cepa *Salmonella enteritidis tiphymurium*

ATCC 14028 del tubo 5 a cada bolsa con lo cual se inoculo teóricamente 4 ufc/g de *Salmonella enteritidis* *tiphymurium* ATCC 14028, estas se homogenizaron en Stomacher y se trabajaron de acuerdo con el flujograma (Anexo 4) del método.

Se hicieron 7 réplicas de este procedimiento y una suspensión inicial libre de contaminación con cepas el cual se denominó como blanco, en total se tuvo 8 muestras, se incubó las 8 bolsas de suspensión inicial a $41.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 horas, cumplido el tiempo de incubación se rotuló la tira de reactivo con los datos de la muestra y se agregó 0.5 ml de la suspensión inicial al pocillo inicial de esta tira (Figura 19), estas tiras se calentaron en la plancha heat&go a $131\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, cumplido el tiempo se dejó enfriar 10 minutos, se colocó los conos y la tira (Figura 20) en el equipo mini vidas se dejó que el equipo realice el proceso automáticamente por 48 minutos, pasado este tiempo el equipo emitió los resultados de las 8 muestras de forma impresa, las muestras que el equipo emitió como positivo se estrió en agar cromogénico para *Salmonella* y se incubo por 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, se observaron las colonias que crecieron y se seleccionó 2 colonias típicas (sospechosas). Finalmente se realizó la confirmación bioquímica según el método ISO 6579:2017AMD1-2020 inoculando las colonias identificadas a Agar triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Lisina descarboxilasa (LIA) y agar urea de christensen, estas bioquímicas fueron incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Concluido el tiempo de incubación se realizó la lectura de la prueba bioquímica y se realizó la prueba serológica de estas colonias.

Figura 19

Inoculación de suspensión inicial incubada



Figura 20

Conos y Tiras de VIDAS UP Salmonella



Nota: Los resultados obtenidos de este procedimiento se muestran en la Tabla 15.

3.13 Prueba de inclusividad y exclusividad

3.13.1 Absorbancia de Cepas dianas y no dianas

Para obtener las absorbancias reportados en la Tabla 9 se procedió a trabajar de acuerdo con el punto 3.11 preparación de suspensión de cepas.

Tabla 9

Promedio de Absorbancias obtenidos

Cepas	Lectura de absorbancia promedio a 450 nm
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028	0.585
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 10708	0.572
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13070	0.579
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	0.536
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	0.532
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	0.64
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0.686
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.742

Nota: Se muestra el resultado promedio que se obtuvo de 3 lecturas de absorbancia para cada cepa.

3.13.2 Inoculación de cepas diana (inclusividad)

La determinación del parámetro de inclusividad solo se realizó para el método alternativo. La inoculación de un medio de crecimiento adecuado se llevó a cabo con una dilución de un cultivo puro de cepa diana. No se añadió ninguna muestra.

A 225 ml de agua peptonada tamponada + suplemento de *Salmonella*, se añadió 1 ml de inóculo del tubo 4 y se incubaron durante 18 h a $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de realizar la prueba VIDAS.

3.13.3 Inoculación de cepas no diana (exclusividad)

Se realizó solo con el método alternativo. La inoculación de un medio de crecimiento adecuado se lleva a cabo con una dilución de un cultivo puro de cepa no diana que fue cultivado en caldo no selectivo. No se añadió ninguna muestra.

A 225 ml de agua de peptona tamponada sin el suplemento de *Salmonella* se inocularon 1ml de suspensión de tubo 4 y se incubó durante 18 h a 41,5 °C antes de realizar la prueba VIDAS.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Muestras analizadas de harina de pescado en el año 2017-2020

En la Tabla 10 se obtiene los datos del número de muestras de harinas de pescados ingresadas mes a mes al laboratorio desde los años 2017 hasta el 2020, estas muestras fueron analizadas para *Salmonella* spp. por el método ISO 6579.

Tabla 10

Muestras de Harinas de Pescado analizadas para Salmonella por el método ISO 6579

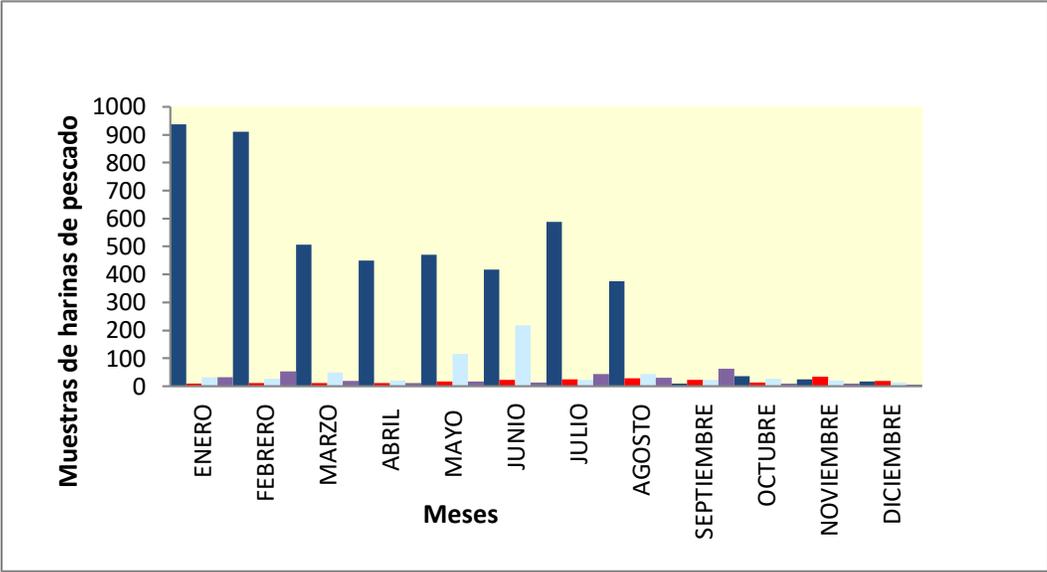
	AÑO			
	2017	2018	2019	2020
Enero	937	10	32	32
Febrero	910	12	27	53
Marzo	506	11	50	20
Abril	450	12	21	11
Mayo	470	18	116	17
Junio	417	22	219	14
Julio	588	24	23	43
Agosto	376	28	43	31
Septiembre	10	23	22	62
Octubre	36	13	26	9
Noviembre	24	35	21	10
Diciembre	17	19	14	5

con los datos obtenidos en la tabla 10 se procedió a realizar un gráfico que se observa en la Figura 21 donde se puede observar que durante los 4 años fue en Enero del 2017 el mes en el

que se analizó 937 haciendo que sea el mayor número de muestras analizadas y el mes de diciembre del 2020 solo se analizó 5 muestras haciendo que sea el número más bajo de muestras analizadas

Figura 21

Variación de muestras analizadas de harina de pescado por meses



En la Tabla 11 se observa que el mayor número de muestras de harina de pescado ingresaron en el año 2017 haciendo un total 4741 muestras, en el siguiente año el ingreso de muestras sufre una disminución cayendo drásticamente a 227 muestras ingresadas, en el 2019 se observa que respecto al año 2018 hubo un ligero aumento de ingreso de muestras de harina de pescado aun así fue muy bajo respecto al año 2017, en el año 2020 el ingreso de harinas de pescado al laboratorio ha disminuido.

Tabla 11

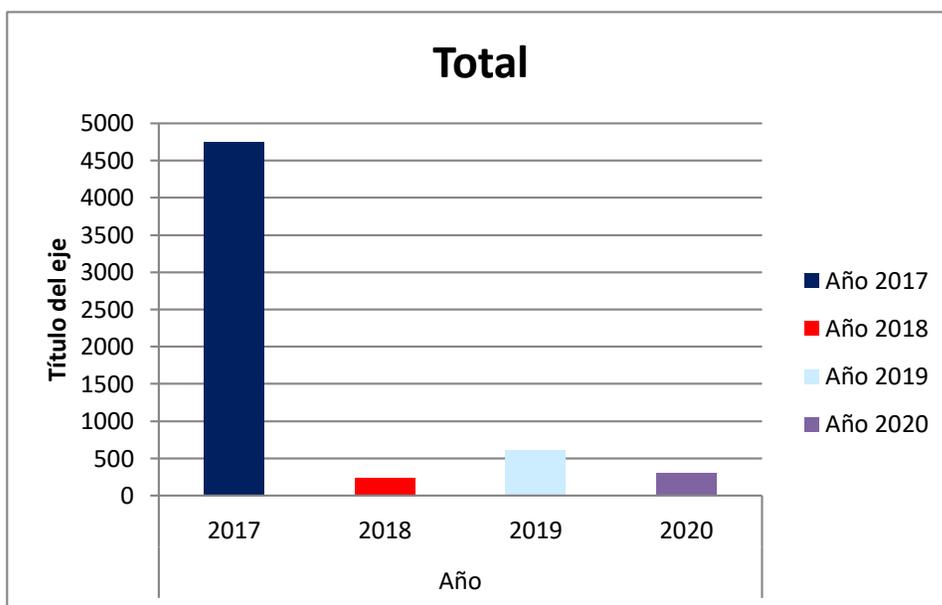
Muestras de harinas de pescado analizadas para Salmonella por año

	Año			
	2017	2018	2019	2020
Total	4741	227	614	307

Con los datos observados en la Figura 22 se concluye que en el año 2017 se analizó el mayor número de muestras durante los 4 años.

Figura 22

Muestras de harinas de pescado analizadas por año



Con los datos obtenidos en la Tabla 11 se observa que desde el 2018 hasta el 2020 no se ha podido recuperar el número de muestras analizadas para *Salmonella* spp. en harina de pescado, esto puede ser debido a diversos factores que pueden darse en las empresas tales como perdida de licitaciones, competencia en el mercado, tiempo de entrega de resultados entre otros.

En la Tabla 12 se observa que el total de muestras analizadas de harinas de pescados en el año 2019 fueron 614 y de estas muestras se obtuvo como resultados ausencia de *Salmonella* spp. a un total de 603 muestras que en porcentaje representa el 98.2 % del total de las muestras analizadas y se podría concluir que un el mayor porcentaje de muestras analizadas están libres de *Salmonella* spp., el ingreso de muestras en el año 2020 es menor comparado con el año 2019 analizando en total 307 muestras de harina de pescado de los cuales 304 muestras se encontraron libres de *Salmonella* spp. en harina de pescado el cual representa el 99% del total de las muestras analizadas.

Tabla 12

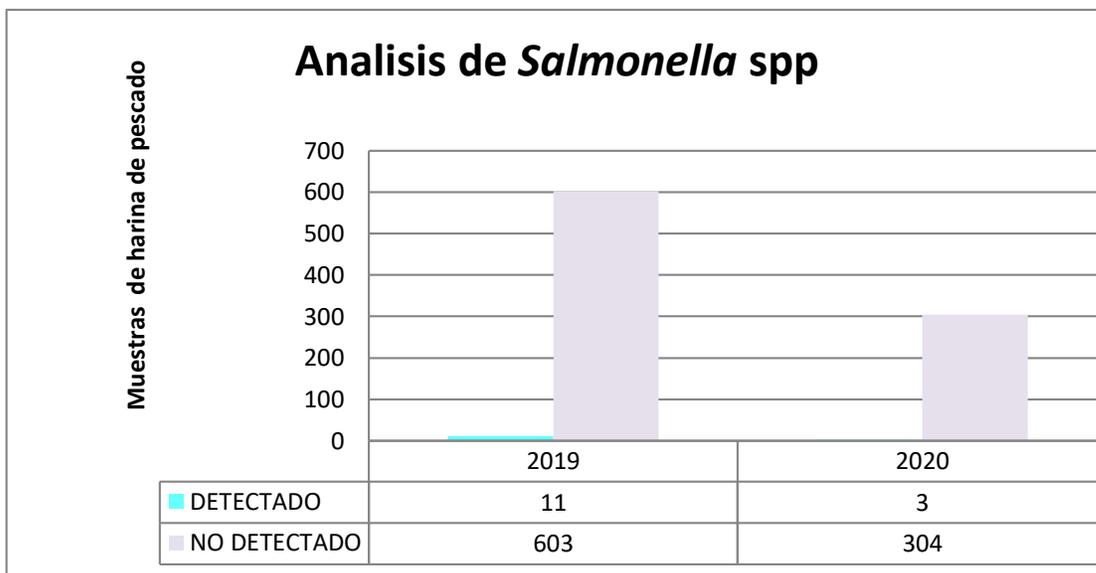
Muestras con presencia de Salmonella spp. en el año 2019-2020

Año	2019		2020	
DETECTADO	11	1.8%	3	1.0%
NO DETECTADO	603	98.2%	304	99.0%
Total	614	100%	307	100%

En la Figura 23 se observa que de las muestras analizadas para *Salmonella* spp. por el método ISO 6579 existe en el año 2019 y 2020 existe una amplia diferencia entre las muestras que dieron resultados positivos (DETECTADO) y de las muestras que dieron resultado negativo (NO DETECTADO).

Figura 23

Muestras de harina de pescado con presencia de Salmonella spp.



En la

Tabla 13 Se realiza la comparación del análisis de *Salmonella* spp. del método tradicional ISO 6579 con el método **VIDAS UP *Salmonella* SPT** y se concluye que el método VIDAS UP *Salmonella* SPT tiene la ventaja en cuanto al tiempo de entrega ya que emite resultado negativo para *Salmonella* spp en 24 horas, así mismo se observa que el método alternativo no requiere de medios de cultivo de enriquecimiento selectivo y en caso de confirmación solo requerirá un medio solido selectivo para *Salmonella*.

Tabla 13*Comparación de métodos ISO 6579 y VIDAS UP Salmonella SPT*

Ensayo	Método ISO 6579	Método VIDAS UP <i>Salmonella</i> (SPT)
Etapas	Pre-enriquecimiento en BPW	Pre-enriquecimiento en BPW
	Incubación a 36°C±1°C x 18 h	Incubación a 41.5°C x 18 a 24 h
	Enriquecimiento selectivo 41.5 °C x 24h	Tratamiento de la muestra calentamiento a 131°C x 5 min de Enfriamiento 10 minutos
	siembra en medios solidos selectivos	Test VIDAS (48 minutos)
	36°C±1°C x 24h	Resultado negativo 1 día
	Resultado negativo 3 días	Pruebas confirmatorias
Ventajas	Pruebas confirmatorias	Es más rápido, se puede procesar hasta 36 muestras, automatizado y de fácil uso
	Sensible de fácil interpretación, bajo costo	Es más costoso
Desventajas	la entrega de resultados es más amplia, se usa grandes cantidades de medios de cultivo, es laborioso	en general, se tiene que hacer la etapa de enriquecimiento y confirmación (si el resultado lo requiere), se tiene que usar bolas con filtro.

Recuento de colonias

Se realizó el recuento de colonias y se obtuvo los siguientes resultados que se reportan en la Tabla 14.

Tabla 14*Microorganismos obtenidos (ufc/ml) en 0.585 (absorbancia promedio)*

Colonias <i>Salmonella enteritidis tiphymurium</i>							
ATCC14028 ufc/ml							
	1ml del Tubo 4			1 ml del duplicado de tubo 4			
Placa de agar TSA	Placa1	Placa2	Placa3	Placa1	Placa2	Placa3	Promedio ufc/ml
	30	33	34	28	31	30	31
	1ml del Tubo 5			1ml del duplicado del tubo 5			
	3	2	4	2	4	3	3

Antes de la incubación de la placa de agar TSA se asumió que el recuento era de 3 ufc/g de *Salmonella enteritidis tiphymurium* ATCC14028 de acuerdo con la absorbancia obtenido y después del tiempo de incubación se realizó el recuento de colonias y se obtuvo diferentes recuentos dando un promedio de 31 ufc/ml en el tubo 4 y 3 ufc/ml en el tubo 5. Con estos datos obtenidos se calculó que el inóculo sembrado a cada bolsa de suspensión inicial fue de 4.5 ufc/ml de *Salmonella enteritidis tiphymurium* ATCC 14028 cumpliendo con el nivel de contaminación que se requiere según la norma ISO 16140-3 protocolo 3, el cual es de 3 a 5 ufc/ml.

4.2 Resultados de muestras analizadas por el método VIDAS UP *Salmonella*

Tabla 15

Resultados de muestras analizadas por el método VIDAS UP Salmonella

Réplicas	Categoría	Cód. de Muestra	Método alternativo	Método alternativo + confirmación	Interpretación
1		M-1	(+)	(+)	PA
2		M-2	(+)	(+)	PA
3	Harinas	M-3	(+)	(+)	PA
4		M-4	(+)	(+)	PA
5	de Pescado	M-5	(+)	(+)	PA
6		M-6	(+)	(+)	PA
7		M-7	(+)	(+)	PA
8		Blanco	(-)	No aplica	----

Cumpliendo con el nivel de contaminación que requiere la ISO 16140-3 (3 a 5 ufc/ml) se obtuvo como resultado 7 muestras positivas PA (concordancia positiva), las muestras positivas se estriaron a agares selectivos incubándola a 36 °C durante 18 a 24h. Las colonias típicas de *Salmonella* fueron sometidas a confirmación bioquímica y serológica, la confirmación se realizó según el método ISO 6579, para la muestra blanco se obtuvo resultado negativo por tal no se necesitó realizar confirmación bioquímica.

4.3 Límite de aceptabilidad

Con los resultados obtenidos en la Tabla 15 se concluye que el método alcanza el límite de aceptabilidad ya que según la norma ISO 16140-3 de las 7 muestras inoculadas con suspensión de cepa inicial se obtuvieron 7 muestras que dieron concordancia positiva (PA).

4.4 Resultados de Inclusividad y exclusividad para la detección de *Salmonella*

Para obtener los resultados mostrados en la Tabla 16 se trabajó de acuerdo con el punto 3.12.1.

Tabla 16

Resultados de Inclusividad y exclusividad para la detección de Salmonella

Microorganismo	Método vidas UP <i>Salmonella</i> SPPT		
	Resultados esperados	Resultados observados	Confirmación de resultado
Inclusividad			
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028 M1	(+)	(+)	N.A.
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 10708 M2	(+)	(+)	N.A.
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13070 M3	(+)	(+)	N.A.
Exclusividad			
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 M4	(-)	(-)	N.A.
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047 M5	(-)	(-)	N.A.
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906 M5	(-)	(-)	N.A.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 M6	(-)	(-)	N.A.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 M7	(-)	(-)	N.A.
Blanco	(-)	(-)	N.A.

Nota: N.A no aplica

Los resultados del análisis de las muestras inoculadas con cepas de inclusividad específicas (*Salmonella entérica*) todos dieron resultados positivos.

De las 5 cepas de exclusividad específicas probadas todos dieron resultado negativo.

No existieron datos anómalos con el número de muestras analizadas en este trabajo, con los resultados obtenidos se concluyó que el método alternativo se desempeñó de manera semejante al método de referencia.

V CONCLUSIONES

1. El trabajo permitió demostrar la capacidad para ejecutar correctamente la detección de *Salmonella* spp. por el método alternativo Vidas UP *Salmonella* SPT en muestras de harinas de pescado
2. Para la ejecución de detección de *Salmonella* spp. por el método tradicional ISO 6579 se requiere mayor tiempo invertido por cada analista así también mayor medio de cultivo en cada una de sus etapas.
3. Con el método VIDAS UP *Salmonella* SPT se puede analizar mayor número de muestras sin la asistencia del analista microbiólogo, el equipo emite los resultados automáticamente y de forma impresa y automáticamente agilizando el tiempo de entrega de un resultado negativo en 24 horas
4. En la verificación del método VIDAS UP *Salmonella* SPT se demostró competencia en la ejecución de la metodología a través los resultados de un número de muestras positivas y negativas.
5. El método alternativo Vidas UP *Salmonella* SPT puede ser utilizado para responder satisfactoriamente la demanda de detección de *Salmonella* de la industria harinera
6. Tanto el método tradicional ISO 6579 y el método Vidas UP *Salmonella* SPT emitieron resultados confiables.

7. Con el análisis de las muestras durante los años 2017-2020 se ha podido observar que existe un gran porcentaje de resultados negativos y se concluye que la mayoría de los resultados se estaría reportando en 24 horas

VI RECOMENDACIONES

1. Validar la metodología Vidas UP *Salmonella* SPT y determinar los parámetros requeridos en los métodos de validación en otras categorías de alimentos de recursos hidrobiológicos como por ejemplo aceite de pescado
2. Realizar capacitación y difusión permanente del método y el tipo de muestra verificado, en el caso que haya personal nuevo realizar los procedimientos debidos para la autorización del analista en la ejecución del método alternativo
3. Verificar la calibración de los equipos utilizados del método alternativo y programar su mantenimiento preventivo.
4. Realizar la validación del método utilizando para la etapa de confirmación agar cromogénico.
5. Realizar la confirmación de los resultados positivos de las muestras analizadas mediante API 20E

VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avantor. (2022). *Ficha técnica de Muller Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth MKTTn*. [Archivo PDF]. <http://www.reactivosparadiagnostico.com/tds/es/?art=301030ZA>
- Becton, D. (2013). *Instrucciones de uso – medios en placa listos para usar*. [Archivo PDF] https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/9874/mod_folder/content/0/Agar%20XLD.pdf?forcedownload=1
- Britania. (2021). *Rappaport Vassiliadis Caldo*. [Archivo PDF]. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707dddb4f87.pdf
- Canet, J. (2020). *Salmonella en la industria avícola. Puntos críticos de contaminación y estrategias de prevención*. <https://goo.su/8CmMb>
- Correa, V. (2018). *Validación del Método de Ensayo Rápido (MERs) Para la Detección e Identificación de la especie Salmonella spp. entérica en la matriz Harina*. <https://hdl.handle.net/20.500.14138/1416>
- Creus, E. (2005). *Salmonella spp. en la alimentación animal: contaminación en materias primas y piensos*. [Archivo PDF]. https://www.porcat.org/download/050501_article_albeitar.pdf
- Cultimed. (s.f.). *Manual básico de microbiología cultimed*. [Archivo PDF]. <http://www.ictsl.net/downloads/microbiologia.pdf>
- Delgado, E. (2020). *Serie de identificación bioquímica*. <https://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2021/03/IS-24-series-de-identificacion-bioquimica.pdf>

- Editorial Etecé. (2020). *Normas ISO*. <https://concepto.de/normas-iso/#ixzz7dHtPKJ6r>
- Elika. (2021). *Salmonella*. <https://seguridadalimentaria.com/fichas-de-peligros/salmonella/>
- FAO. (2002). *Inocuidad y comercio de la harina de pescado*. <https://www.fao.org/3/Y6127S/Y6127S.htm>
- FAO. (2021). *Information and analysis on markets and trade of fisheries and aquaculture products* <https://www.fao.org/in-action/globefish/publications/es/>
- Fish, D. (2018). *Harina de pescado: importancia en la alimentación animal*. <https://disglobal.es/harina-pescado-importancia-la-alimentacion-animal/>
- Flores, R. (1981). *Epizootiología de la salmonelosis en bovinos, porcinos y aves* <https://fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c05.pdf>
- Freschi, M.; Cabrera, M.; Ruarte, S.; Garbini, A. y Jakubowski, N. (2018). *Verificación intralaboratorio de la norma ISO 6579: método horizontal para la detección de Salmonella spp. En fórmula en polvo para lactantes*. <https://goo.su/Uabju>
- Gut Microbiota for Health. (2012). *Agente patógeno*. <https://goo.su/74DQRqk>
- Indexmundi. (2022). *Producción de harina de pescado de Perú*. <https://goo.su/EVdqM>
- Indexmundi. (2022). *Producción de harina de pescado de Perú en miles de FOB*. <https://goo.su/ba6P4>
- Industrias Pesqueras. (2021). *Producción mundial de harina y aceite de pescado*. <https://goo.su/m6NIR>
- Insunza, M. y Soto, A. (1998). *Salmonelosis*. <https://tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/6249>

- Organizacion internacional de normalización. (2016). *Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 1: Vocabulario*. ISO 16140-1. (2016).
- ISO 6579. (2017). *Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella. Part 1: Detection of Salmonella spp.* <https://goo.su/v2tq>
- Juárez, C. (2020). *Impacto de la contaminación por Salmonella spp.* <https://thefoodtech.com/seguridad-alimentaria/impacto-de-la-contaminacion-por-Salmonella/>
- Maza, S. (1994). *La Pesquerita pulpa de pescado salada*. <https://repositorio.itp.gob.pe/handle/ITP/115>
- MDM Científica. (2019). *Cepas ATCC*. <https://mdmcientifica.com/para-que-sirven-las-cepas-atcc-microbiologics/>
- Navarro, R. (2017). *Salmonella, biofilms y persistencia*. Blog sobre seguridad alimentaria. <https://www.betelgeux.es/blog/2017/02/14/539/>
- Produce. (2021). *Boletín del Sector Pesquero*. <https://bit.ly/3U90zK8>
- Produce. (2021). *Ministerio de la Producción Resolución Ministerial N° 138-2021-Produce*. <https://goo.su/EWCL>
- PromPerú. (2021). *Desarrollo del sector pesquero y acuícola* <https://goo.su/Rodj>
- Puertas, M. y Maldonado, H. (2009). *Orígenes de la industria pesquera peruana. Studium Veritatis*, 7(12-13), 241-260. <https://doi.org/10.35626/sv.12-13.2009.186>
- Quiroz, C. (2012). *Supervivencia de Salmonella enteritidis en harina de pescado de Engraulis ringens*. <https://goo.su/zgVSu>

- Ramírez, N. (2014). *Harina a partir de los residuos sólidos crudos del procesado de conservas de filete y grated de Colossoma macropomum (Gamitana) por el método de prensado*.
<https://goo.su/If4Rko>
- Riquelme, H. (2015). *Verificación de un método alternativo para la Detección de salmonella spp. En matrices de alimentos*. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/134833>
- RM N° 615. (2003). *Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano*.
http://www.digesa.minsa.gob.pe/norma_consulta/Proy_RM615-2003.pdf
- Robledo, A. (2015). *Investigación de Salmonella spp. en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos*. <https://goo.su/zlff0>
- Rosales, E.; Caicedo, K.; Navas, O.; Castro, H. (s.f.). *Taxonomía de Salmonella spp*.
<https://slideplayer.es/slide/13522291/>
- Ruiz, M.; Ramallo, G.; Colello, R. (2018). *Diferentes métodos para aislamiento y detección de Salmonella spp. en canales porcinas*. <https://goo.su/8BrUJe>
- Sanipes. (2016). *Convenio marco de cooperación interinstitucional, entre el organismo nacional de sanidad pesquera y el instituto nacional de calidad*. [Archivo PDF].
<https://goo.su/FVRW7wV>
- Schlicht, A. (1997). *Comparación de dos técnicas de diagnósticos de Salmonella spp. en harina de pescado*. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/1997/fvs344c/doc/fvs344c.pdf>
- Sepúlveda, C. (2017). *Muestreo microbiológico de superficies de equipos en contacto con harina de pescado durante el periodo 2010-2012*.
<https://hdl.handle.net/20.500.12952/3447>
- SIMED. (2022). *Entrenamiento MINIVIDAS KIT UP Salmonella (SPT)* [comunicación personal]. Junio 2022.

- Sociedad Nacional de Pesquería. (2022). *Harina de pescado: Perú lidera su producción mundial*. <https://www.snp.org.pe/industria-pesquera/haSOrina-de-pescado/>
- Susá, J. (2011). *Aplicación de sinérgica de agentes orgánicos en la inhibición y reducción de carga microbiana para harinas de pescado para exportación*. <https://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/31407>
- UNE en ISO 7218,2008. *Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal requisitos generales y el examen microbiológico*. [Archivo PDF]. <https://goo.su/WDGCNx>
- Villalobos, D. (2015). *Validación de la técnica de análisis enzimático ligado a fluorescencia (elfa) para la detección de salmonella spp. en materia prima para la producción de pienso para animales*. <https://goo.su/UfihgX>
- Zevallos, G. (2018). *Análisis microbiológico de sándwiches de hamburguesa de Pollo preparados en kioscos que expenden alimentos en la Universidad nacional de San Agustín durante los meses Setiembre-diciembre, arequipa-2018*. <https://goo.su/RzEV2>

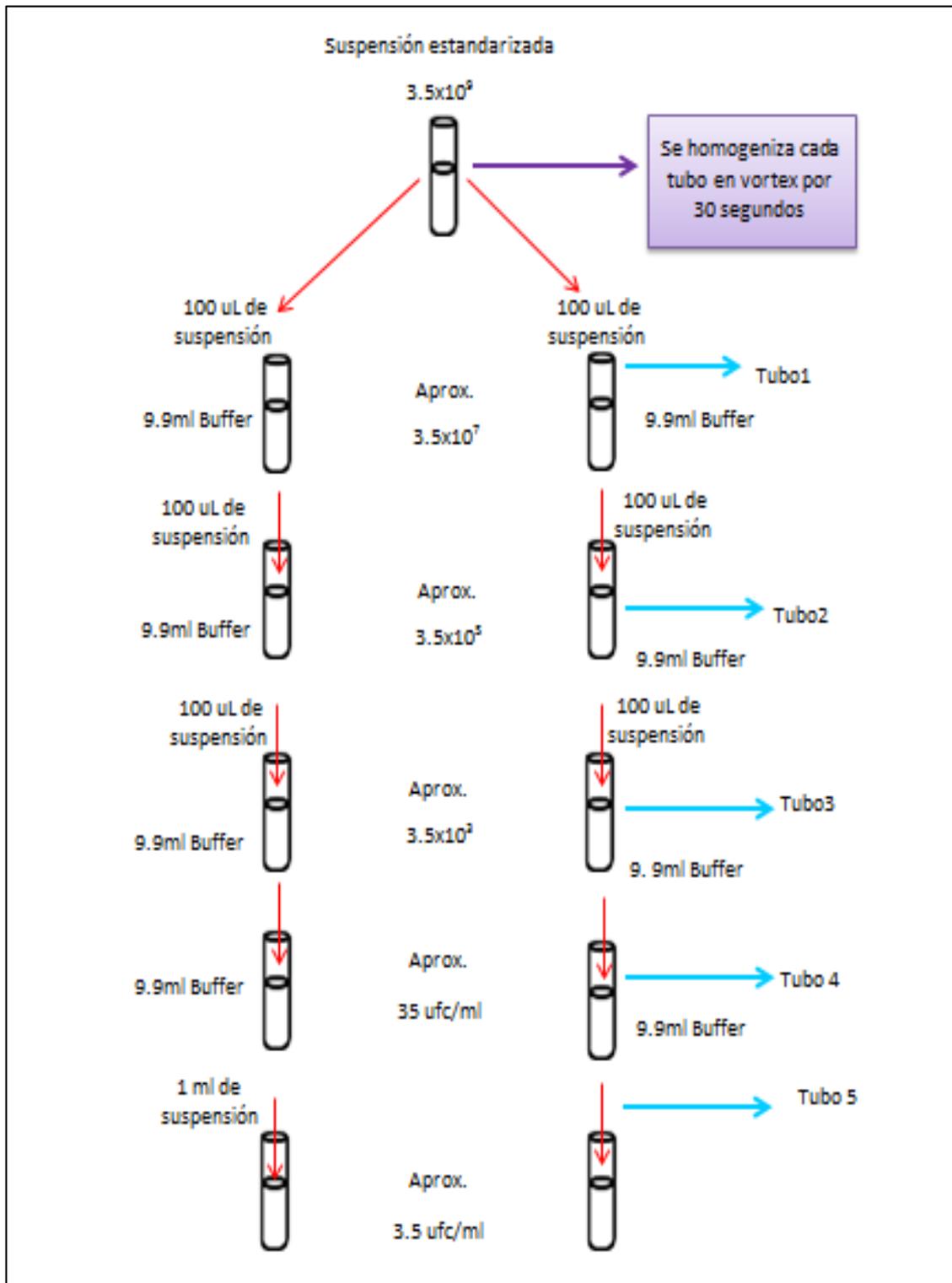
VIII ANEXOS

Anexo 1: Lectura de absorbancia medido en el equipo ELISA

The screenshot shows the Gen5 3.02 software interface. The main window displays a data table for 'Plate 1' with columns numbered 1 to 12 and rows labeled A through H. The 'Data' dropdown is set to '450'. The value '0.581' in row A, column 12 is highlighted with a red box. Below the table are 'Edit' and 'Mask' buttons, and a 'Help' button is in the bottom right corner.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.209	0.195	0.835	0.399	0.373	0.334	0.533	0.619	0.065	0.576	0.126	0.581
B	0.173	0.175	0.858	0.476	0.571	0.414	0.554	0.052	0.356	0.388	0.274	0.587
C	0.181	0.151	0.057	0.062	0.051	0.050	0.055	0.049	0.055	0.053	0.053	0.588
D	0.055	0.051	0.054	0.057	0.052	0.056	0.052	0.054	0.053	0.051	0.054	0.224
E	0.061	0.050	0.054	0.053	0.056	0.058	0.058	0.051	0.056	0.058	0.059	0.057
F	0.052	0.054	0.058	0.064	0.053	0.051	0.053	0.063	0.057	0.060	0.055	0.054
G	0.054	0.054	0.053	0.053	0.051	0.055	0.052	0.059	0.063	0.055	0.054	0.054
H	0.051	0.053	0.052	0.051	0.053	0.062	0.060	0.053	0.057	0.053	0.056	0.056

Anexo 2: Esquema de verificación de la concentración de microorganismos



Anexo 3: Sistema para registro de muestras

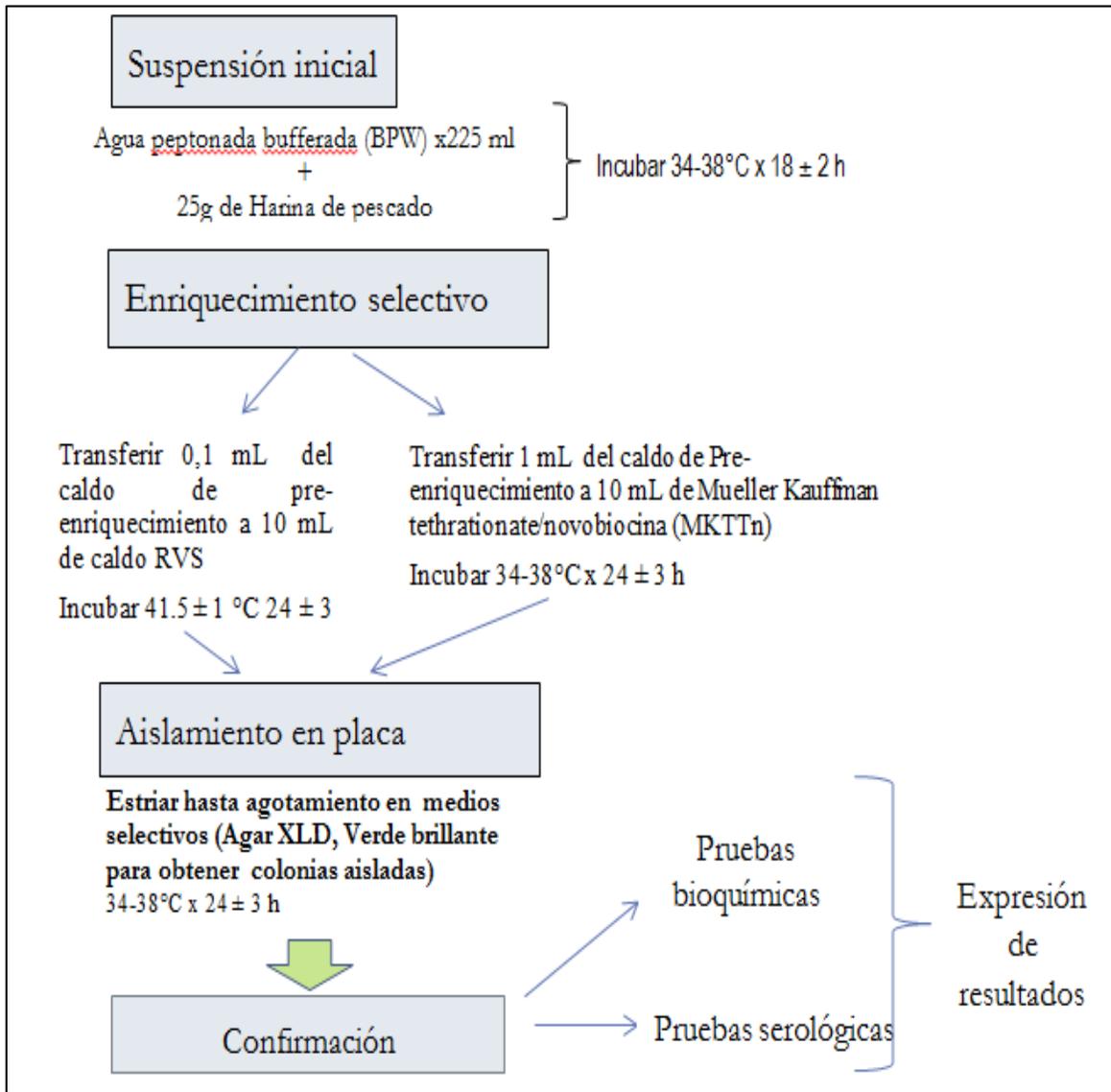
Sistema de Gestión de Servicios [INASSA]
 Archivo Editar Documento Herramientas Ayuda

Documentos Pendientes

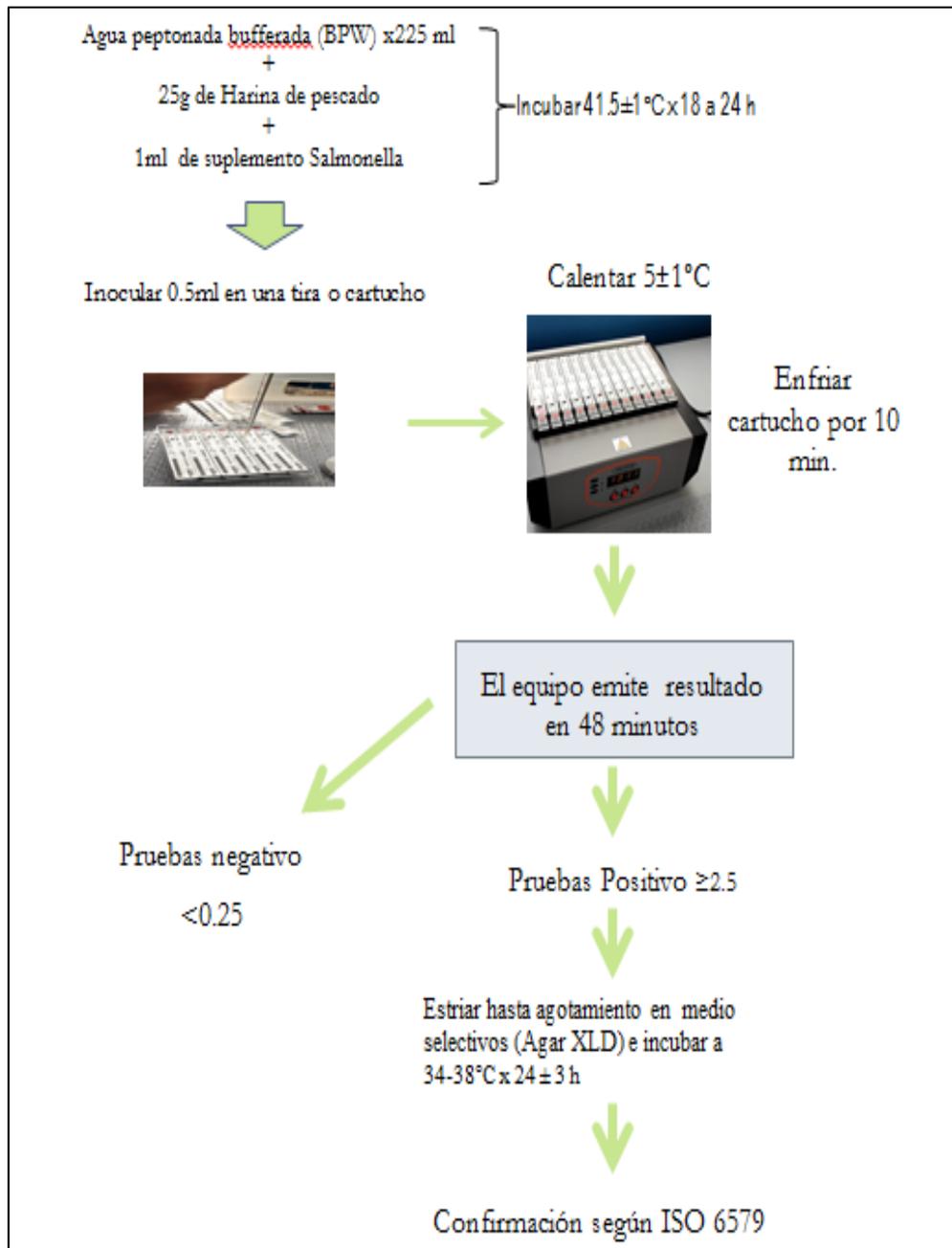
Tipo Doc:
 Período: al
 Referencia:

Serie	Correlativo	Lab.		Corr. Prev.	Referencia
OTR	000225256	Microbiolog	M	000179256	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225255	Microbiolog	M	000179255	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225254	Microbiolog	M	000179254	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225253	Microbiolog	M	000179253	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225252	Microbiolog	M	000179252	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225248	Microbiolog	M	000179248	HARINA DE PESCADO
OTR	000225243	Microbiolog	M	000179244	HARINA DE PESCADO
OTR	000225235	Microbiolog	M	000179239	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225234	Microbiolog	M	000179238	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225232	Microbiolog	M	000179236	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225229	Microbiolog	M	000179234	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225222	Microbiolog	M	000179205	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225221	Microbiolog	M	000179210	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225220	Microbiolog	M	000179209	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225219	Microbiolog	M	000179208	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225218	Microbiolog	M	000179206	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225217	Microbiolog	M	000179228	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225216	Microbiolog	M	000179227	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225215	Microbiolog	M	000179226	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225214	Microbiolog	M	000179225	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225213	Microbiolog	M	000179224	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225212	Microbiolog	M	000179223	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225211	Microbiolog	M	000179220	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225210	Microbiolog	M	000179219	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225203	Microbiolog	M	000179214	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225202	2 Microbiolog	0	000000000	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225202	Microbiolog	M	000179213	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225201	Microbiolog	M	000179212	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225183	Microbiolog	M	000179162	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225182	Microbiolog	M	000179169	HARINA DE PESCADO
OTR	000225181	Microbiolog	M	000179195	HARINA DE PESCADO STEAM DRIED
OTR	000225179	Microbiolog	M	000179188	HARINA DE PESCADO SETAM DRIED

Anexo 4: Flujograma de metodología ISO: 2017 AMD 2020



Anexo 5: Flujograma de método VIDAS UP Salmonella SPT



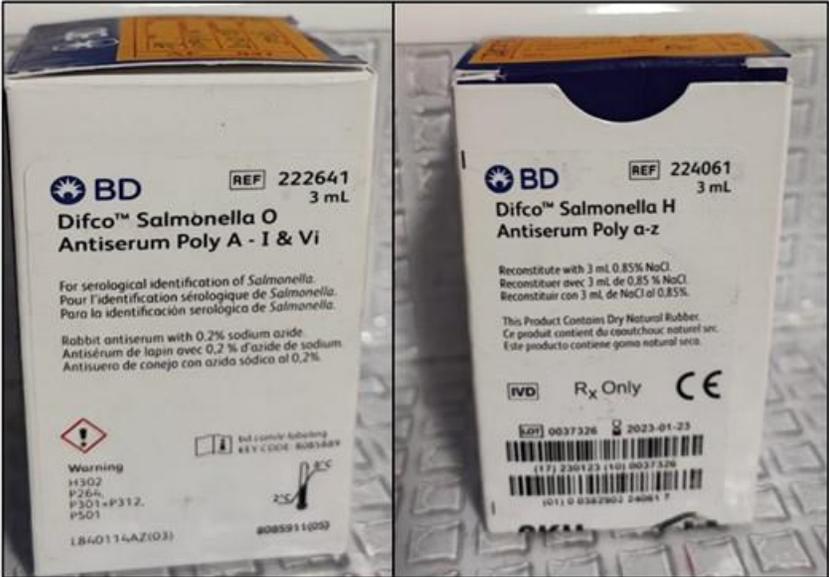
Anexo 6: Conos insertados en equipo VIDAS



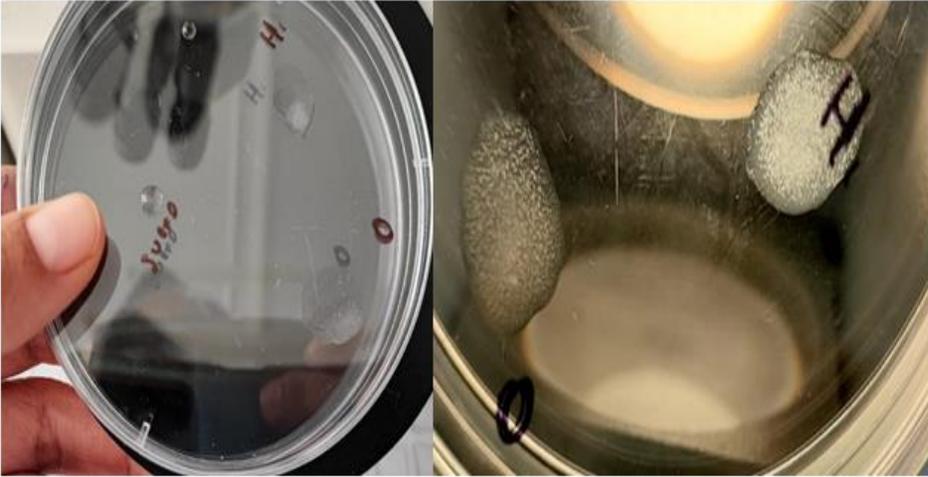
Anexo 7: Medios de cultivo deshidratado



Anexo 8: Suero para *Salmonella*



Anexo 9: Antisuero O y H para *Salmonella*



Anexo 10: Reporte del método VIDAS UP *Salmonella* SPT

Lot #1: 230420-0
Standard usado
Terminado: 14:26:21 03R4022
RFV = 3938

VT Negativo < 0.25
VT Positivo >= 0.25

Posición: **B1**
ID muestra: 260823
Ruido de fondo: 117 RFV: 105
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

Posición: **B2**
ID muestra: 85.1
Ruido de fondo: 118 RFV: 97
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

Posición: **B3**
ID muestra: 85.2
Ruido de fondo: 118 RFV: 102
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

Posición: **B4**
ID muestra: 85.3
Ruido de fondo: 117 RFV: 103
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

Posición: **B5**
ID muestra: 85.4
Ruido de fondo: 118 RFV: 103
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

Posición: **B6**
ID muestra: 85.5
Ruido de fondo: 118 RFV: 81
VT: 0.02 Resultado: **Negativo**

Anexo 11: Tabla de interpretación de las pruebas bioquímicas para *Salmonella*

Prueba ^a (9.5.3.2 a 9.5.3.7)	Cepa de <i>Salmonella</i>									
	S. Typhi		S. Paratyphi A		S. Paratyphi B		S. Paratyphi C		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 sulfuro de hidrógeno en TSI	+	97	-		10		+		+	92
Hidrólisis de urea	-	0	-		0		-		-	1
Descarboxilación de la lisina	+	98	-		0		+		+	95
Reacción de β-galactosidasa	-	0	-		0		-		-	2 ^e
Reacción de Voges-Proskauer	-	0	-		0		-		-	0
Producción de indol	-	0	-		0		-		-	1

^a De la referencia [5].

^b Estos porcentajes indican que no todos los aislamientos de serotipos de *Salmonella* dan las reacciones marcadas como + ó -. Estos porcentajes pueden variar dentro de un mismo serotipo y entre un serotipo y otro de los causantes de toxi-infecciones alimentarias de diferentes procedencias.

^c Los porcentajes no son conocidos según la literatura disponible.

^d *Salmonella* Typhi no produce gas.

^e Las *Salmonella enterica* subespecie *arizonae* dan una reacción de lactosa positiva o negativa pero son siempre β-galactosidasa positivo. Para el estudio de estas cepas puede ser útil realizar pruebas complementarias.

FUENTE ISO 6579