

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**



Validación del Método de Prueba para la Determinación de *Salmonella*  
spp. en Compostas y Lixiviados, para Uso Agrícola

Por:

**ELVIRA ALEJANDRA ESCALANTE REYNA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Saltillo, Coahuila, México.

Marzo 2023

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**  
**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

Validación del Método de Prueba para la Determinación de *Salmonella*  
spp. en Compostas y Lixiviados, para Uso Agrícola

Por:

**ELVIRA ALEJANDRA ESCALANTE REYNA**

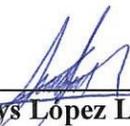
TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Aprobada por el Jurado Examinador

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Silvia Yudith Martínez**  
**Amador**  
Asesor principal interno

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. Melbys López López**  
Asesor principal externo

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Pedro Pérez Rodríguez**  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
**MC. Laura María González**  
**Méndez**  
Coasesor



  
\_\_\_\_\_  
**MC. Sergio Sánchez Martínez**  
Coordinador de la División de Ingeniería

Saltillo, Coahuila, México.

Marzo 2023

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

Validación del Método de Prueba para la Determinación de *Salmonella*  
spp. en Compostas y Lixiviados, para Uso Agrícola

Por:

**ELVIRA ALEJANDRA ESCALANTE REYNA**

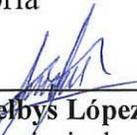
TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Aprobada por el Comité de Asesoría

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Silvia Yudith Martínez  
Amador**  
Asesor principal interno

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. Melbys López López**  
Asesor principal externo

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Pedro Pérez Rodríguez**  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
**MC. Laura María González  
Méndez**  
Coasesor

## DERECHOS DEL AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Yo, Elvira Alejandra Escalante Reyna, declaro que:

1. El trabajo de investigación titulado “Validación del Método de Prueba para la Determinación de *Salmonella* spp. en Compostas y Lixiviados, para Uso Agrícola” es un producción personal.
2. He respetado las referencias para las fuentes de consulta, por lo tanto el proyecto no ha sido plagiado total ni parcialmente.
3. El proyecto no ha sido autoplagiado, es decir no ha sido presentado no publicado anteriormente. De identificarse plagio (información sin citar autores), autoplagio (presentar como nuevo algún trabajo de investigación propio que ya ha sido presentado), falsificación (representar falsamente las ideas de otro), asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven en caso de existir.



**Firma**

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** todo poderoso por permitirme la vida y salud; gracias por ser mi fuerza en todos estos años.

A la **Dra. Silvia Yudith Martínez Amador** mi maestra, tutora y asesor de tesis por abrirme las puertas en su laboratorio, sus consejos, conocimientos y apoyo durante estos años.

A la **M.C. Melbys López López** mi jefa y asesor externo por darme la oportunidad y apoyo para trabajar en este proyecto.

A mi alma mater la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por brindarme la oportunidad de poder ser un ingeniero.

Di a la sabiduría: Tú eres mi hermana, Y a la inteligencia llama parienta

Proverbios 7:4

Reina Valera 1960

## DEDICATORIA

A mi madre **Elvira Reyna Arriazola** por su confianza y apoyo incondicional a lo largo de mi desarrollo académico.

A mi padre **Juan Escalante Nájera**, porque en esta última etapa de estudios me brindó su apoyo.

A mi hermana **Marcela Yudith** por ser un apoyo fundamental a lo largo de la carrera.

## ÍNDICE

DERECHOS DEL AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
RESUMEN.....	12
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
1.1. Objetivos .....	14
1.2. Objetivo General.....	14
1.3. Objetivos Específicos .....	14
1.4. Hipótesis.....	14
1.5. Justificación.....	14
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1. Generalidades .....	16
2.2. Métodos microbiológicos.....	16
2.3. Microbiología tradicional.....	16
2.3.1. Selectividad .....	17
2.3.2. Especificidad .....	17
2.3.3. Productividad.....	17
2.4. Métodos Microbiológicos Rápidos.....	17
2.5. Validación de métodos microbiológicos.....	18
2.6. Parámetros de validación .....	18
2.6.1. Límite de detección (LD).....	18
2.6.2. Robustez.....	18
2.6.3. Repetibilidad (R) .....	19
2.6.4. Reproducibilidad (r).....	19
2.6.5. Eficacia relativa (ER).....	19
2.6.6. Especificidad relativa (ES) (Exclusividad) .....	20
2.6.7. Sensibilidad relativa (SR) (Inclusividad).....	20

2.7.	Método normalizado .....	21
2.8.	Método no normalizado .....	21
2.9.	Agricultura Orgánica .....	22
2.10.	Características de la agricultura orgánica .....	22
2.11.	Producción orgánica en México .....	22
2.12.	Composta .....	23
2.13.	Compostas como productos en la agricultura orgánica .....	23
2.14.	Lixiviados.....	24
2.15.	Agentes patógenos.....	24
2.16.	Contaminantes patógenos en composta y lixiviados .....	25
2.17.	Fuentes de contaminación en Compostas y Lixiviados .....	26
2.18.	Salmonella spp.....	27
2.19.	Epidemiología .....	27
2.20.	Método para el aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.....	28
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
3.1.	Ubicación del experimento .....	30
3.2.	Requerimientos usados .....	30
3.2.1.	Equipo utilizado.....	30
3.2.2.	Materiales.....	31
3.2.3.	Reactivos.....	31
3.2.4.	Medios de cultivo .....	32
3.2.5.	Material de referencia .....	32
3.2.6.	Método de ensayo .....	33
3.3.	Expresión de resultados .....	34
3.3.1.	Validación del método para <i>Salmonella</i> spp.....	34
3.4.	Descripción del método de ensayo .....	36
3.4.1.	Pre-enriquecimiento.....	36
3.4.2.	Enriquecimiento .....	36
3.4.3.	Aislamiento e identificación.....	37
3.4.4.	Selección de colonias para su confirmación .....	39
3.4.5.	Confirmación bioquímica .....	39
3.4.6.	Prueba oxidasa.....	42
3.4.7.	Identificación presuntiva del género <i>Salmonella</i> spp.....	42
3.4.8.	Detección de los antígenos Poly A-I & Vi.....	43

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	44
4.1. Verificación de las muestras .....	44
4.2. Límite de detección (LD) .....	44
4.2.1. Cálculo del LD en Composta (Analista 1) .....	44
4.2.2. Calculo del LD en Lixiviado (Analista 1) .....	45
4.2.3. Cálculo del LD en composta (Analista 2) .....	46
4.2.4. Cálculo del LD en Lixiviado (Analista 2) .....	47
4.3. Robustez .....	48
4.3.1. Criterio de Aceptación .....	49
4.4. Repetibilidad (R) .....	50
4.5. Reproducibilidad .....	53
4.6. Análisis de los resultados .....	55
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	56
<b>VI. REFERENCIAS</b> .....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Temperatura necesaria para la eliminación de algunos patógenos.....	24
<b>Tabla 2.</b> Límites microbiológicos de tolerancia según las diferentes normas .....	25
<b>Tabla 3.</b> Cepas de referencia para determinar en compostas y lixiviados.....	31
<b>Tabla 4.</b> Participantes en la validación.....	33
<b>Tabla 5.</b> Descripción general de las matrices .....	33
<b>Tabla 6.</b> Características generales de los microorganismos controles.....	34
<b>Tabla 7.</b> Reproducibilidad realizada por el analista 2, en composta y lixiviado .....	39
<b>Tabla 8.</b> Verificación de las tres repeticiones de composta y lixiviados.....	43
<b>Tabla 9.</b> Límite de Detección Analista 1 en composta.....	44
<b>Tabla 10.</b> Límite de detección analista 1 en lixiviado.....	45
<b>Tabla 11.</b> Límite de detección analista 2 en composta.....	46
<b>Tabla 12.</b> Límite de detección analista 2 en lixiviado.....	48
<b>Tabla 13.</b> Asignación de valores de condiciones evaluadas para el parámetro robustez en composta y lixiviados .....	47
<b>Tabla 14.</b> Robustez analista 1 y 2 (composta).....	48
<b>Tabla 15.</b> Robustez analista 1 y 2 (lixiviado) .....	49
<b>Tabla 16.</b> Repetibilidad realizada por el analista 2, en composta .....	50
<b>Tabla 17.</b> Repetibilidad realizada por el analista 2, en lixiviado .....	51
<b>Tabla 18.</b> Reproducibilidad realizada por el analista 1, en composta y lixiviado .....	52
<b>Tabla 19.</b> Reproducibilidad realizada por el analista 2, en composta y lixiviado .....	53
<b>Tabla 20.</b> Evaluación de los criterios de aceptación .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Flujoograma, determinación de <i>Salmonella</i> spp .....	32
<b>Figura 2.</b> Pre-enriquecimiento de las muestras con Agua peptonada amortiguada...35	
<b>Figura 3.</b> Enriquecimiento .....	35
<b>Figura 4.</b> Aislamiento en Agares selectivos de muestras de compostas.....	36
<b>Figura 5.</b> Aislamiento en Agares selectivos de muestras de lixiviados.....	36
<b>Figura 6.</b> Aislamiento en Agares selectivos de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	37
<b>Figura 7.</b> Aislamiento en Agares selectivos de <i>Salmonella diarizonae</i> .....	37
<b>Figura 8.</b> Aislamiento en Agares selectivos de <i>Salmonella bispebjerg</i> .....	37
<b>Figura 9.</b> Aislamiento selectivo de <i>Escherichia coli</i> .....	38
<b>Figura 10.</b> Crecimiento de las colonias seleccionadas en placas de ACE .....	38
<b>Figura 11.</b> Reacción de oxidasa con <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Vibrio cholerae</i> .....	41
<b>Figura 12.</b> Identificación presuntiva del género <i>Salmonella</i> spp., en muestra de composta .....	42
<b>Figura 13.</b> Detección de los antígenos Poly A-I & Vi en muestras de composta y lixiviado.....	42

## RESUMEN

Las infecciones en el ser humano por *Salmonella* spp., se deben comúnmente por la ingestión de alimentos contaminados, como pollos, cerdos y bovinos. El consumo de frutas y vegetales, no queda fuera de brotes por *Salmonella* spp., se ha comprobado que la contaminación en las frutas y verduras puede surgir por el agua utilizada en los sistemas de riego, malas prácticas de manipulación, suelo y abonos utilizados.

Esta investigación se realizó para validar el método cualitativo “determinación de *Salmonella* spp.” descrito en la Norma Oficial Mexicana 210, de su apéndice A, para comprobar su alcance en las matrices de compostas y lixiviados de uso agrícola, dicho método microbiológico que detecta la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. se implementó tomando como base la guía para validar métodos microbiológicos emitida por el CNRPYC (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes) del SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) donde se evaluó los criterios de límite de detección, reproducibilidad, repetibilidad, eficacia relativa, especificidad relativa, sensibilidad relativa y robustez.

De acuerdo a los resultados comparables obtenidos se demuestra que el método es repetible y reproducible para aplicarlos en compostas y lixiviados. Al implementar este método, se está brindando fiabilidad de resultados a productores mexicanos de compostas y lixiviados de uso agrícola y se impacta en la inocuidad de alimentos de nuestro país, aportando reducción de riesgos de contaminación en los procesos industriales de las cadenas agroalimentarias.

**Palabras clave:** *Salmonella* spp., validación de método, compostas, lixiviados, contaminación.

## I. INTRODUCCIÓN

La comunidad científica y las autoridades sanitarias determinaron que los Estados Unidos de América y el Reino Unido, al año ocurren 1, 412,498 y 73,193 infecciones por *Salmonella* spp., se estima que este patógeno es responsable de aproximadamente 30% de las muertes. Debido a esta problemática consideran que es pertinente atajar todas las vías de transmisión y establecer métodos o sistemas de vigilancia para reducir las infecciones por esta bacteria (Zaidi Mussaret, López Constantino, 2006).

Los productos de uso agrícola como compostas y lixiviados son una de las fuentes de contaminación cruzada en cultivos de consumo humano, por infecciones de diferentes microorganismo patógenos, poniendo en riesgo la salud pública. Las compostas y lixiviados en la actualidad se están posicionando como un tema para la solución de problemas de soporte y fuente de nutrientes para muchos cultivo, y más ahora donde se manejan productos orgánicos y fuentes de energías limpias, por esto es de importancia para los productores de compostas y lixiviados garantizar a los productores en la agricultura una buena higienización o inocuidad de estos productos. Hoy en día se tiene poco alcance en los métodos de determinación microbiológica de patógenos para estos tipos de matrices (Rodríguez Diana Marcela, Torres Francy Elaine, Gutiérrez Edna Viviana, López Maritza Paola & Carrascal Ana Karina, 2008).

En una validación de métodos microbiológicos se desarrollan un conjunto de procesos para la implementación de una técnica analítica y experimental microbiológica en laboratorios interesados en el diagnóstico y detección de microorganismos patógenos en productos vegetales y superficies de contacto vivas e inertes de interés, guiándose y cumpliendo criterios establecidos en Guías de Validación de Métodos Microbiológicos tomando en cuenta métodos de Normativas Oficiales Mexicanas o No Normativas (Arias Palacios *et al*, 2013); para finalmente al ser reconocidas estas competencias técnicas, por su cumplimiento, ser posteriormente aplicadas (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, 2021).

## **1.1. Objetivos**

### **1.2. Objetivo General**

Validar el método de prueba para la determinación de *Salmonella* spp. en compostas y lixiviados de uso agrícola.

### **1.3. Objetivos Específicos**

1. Implementar el Apéndice A Normativo. Método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp, NOM-210-SSA-2014, en compostas y lixiviados para uso agrícola.
2. Evaluar los criterios de límite de detección, reproducibilidad, repetibilidad, eficacia relativa, especificidad relativa, sensibilidad relativa y robustez.

### **1.4. Hipótesis**

La Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014; Productos y Servicios, implementa la determinación de microorganismos indicadores y determinación de microorganismos patógenos y su Apéndice A Normativo (Método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp.), es un método apto para detectar *Salmonella* spp., en compostas y lixiviados que se puede implementar y desarrollar en el laboratorio de microbiología en el área de Inocuidad Agroalimentaria.

### **1.5. Justificación**

La contaminación de alimentos se da en cualquiera de las etapas de proceso, como fabricación, distribución, preparación o manipulación, aunque la responsabilidad recae principalmente en el productor. No todos los manipuladores de alimentos y consumidores entienden la importancia de adoptar prácticas higiénicas básicas al comprar, vender y preparar alimentos para proteger su salud y la de la población en general (Organización Mundial de la Salud, 2020).

Las compostas en la producción de alimentos en la agricultura de cultivos hortícolas y cultivo de hongos comestibles son empleadas como sustrato en la nutrición mineral de las plantas y enmendante orgánico que actúa exclusivamente sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo (Tortosa Germán, 2013).

Por ello, la importancia de obtener compostas y lixiviados libres de patógenos, que garanticen que al reutilizar y valorizar los materiales orgánicos, se esté obteniendo materia orgánica estable y líquidos residuales que no ocasionen contaminación cruzada, más bien que sean inocuos y contribuyan en la recuperación de suelos degradados, biorremediación, control biológico, producción hortícola y ornamental o bien en su uso como sustratos para plantines de viveros u hongos comestibles (Laconte María Corina, 2019). Sin embargo, existe carencia de normativas específicas para compostas y lixiviados de uso agrícola, siendo la mayoría normas de observancia obligatoria en el territorio nacional para efectuar métodos microbiológicos en muestras de alimentos.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades

Los laboratorios de microbiología garantizan que sus resultados emitidos a sus usuarios son válidos y confiables, por medio de un control de calidad, que evalúa y documenta el desempeño de cada uno de los aspectos de sus procesos; inicia con la calidad de la muestra que recibe, seguido de la eficiencia de los reactivos, los medios de cultivo, el funcionamiento de los diversos instrumentos y equipos, el analista y la verificación o validación de los resultados obtenidos. Los controles de calidad son determinados por una validación de método a través del fundamento estadístico adecuado, para los fines previstos; se debe realizar de forma ordenada, confiable y trazable, teniendo en cuenta los requerimientos del método, su aplicabilidad, los analitos, las concentraciones y la matriz que se desea utilizar, por lo tanto, la validación de los métodos microbiológicos debe reflejar las condiciones reales del ensayo, utilizando matrices inoculadas, con un nivel conocido de contaminantes, con el fin de imitar la actividad natural del microorganismo en las muestras (Vargas Hoyos Karen, Vidal Arboleda Juana, 2018).

### 2.2. Métodos microbiológicos

Los métodos de microbiología son técnicas utilizadas para el estudio de bacterias, hongos y protistas microscópicos e incluyen métodos para estudiar, cultivar, teñir, identificar, diseñar y manipular microbios (Nature portfolio, 2022).

### 2.3. Microbiología tradicional

Es la reproducción de un entorno ambiental, con los nutrientes y la atmósfera que permita un desarrollo de los microorganismos en condiciones ideales, mediante la siembra en un medio de cultivo controlado y en condiciones ambientales reguladas durante un periodo de tiempo conocido y preestablecido, de forma que crezcan las colonias de microorganismos que nos permitan identificarlos directamente y poder cuantificarlos. Las colonias de microorganismos que obtenemos nos permiten no solo la cuantificación o investigación del microorganismo, sino poder obtener cultivos puros para poder crear una colección de cepas que nos permita conservar, recuperar, comparar estos microorganismos en posteriores ensayos que realicemos. En algunos

casos la microbiología tradicional se base en tres principios básicos (Montoro Lorite Antonio, 2019).

### **2.3.1. Selectividad**

Mediante el uso de medios de cultivo con sustancias que limiten y eviten el crecimiento incontrolado de los microorganismos que podrían llevarnos a confusión y podrían dificultar la interpretación de los resultados finales (Montoro Lorite Antonio, 2019).

### **2.3.2. Especificidad**

Tanto los medios de cultivo, la temperatura de incubación como condiciones ambientales de atmósferas modificadas, se orientan a reproducir las condiciones ideales que van a favorecer el crecimiento de los microorganismos concretos que queremos investigar y cuantificar (Montoro Lorite Antonio, 2019).

### **2.3.3. Productividad**

Las técnicas de cultivo nos permiten establecer una relación directa entre el número de microorganismos sembrados y el número de colonias visualizadas tras el periodo de incubación establecido (Montoro Lorite Antonio, 2019).

## **2.4. Métodos Microbiológicos Rápidos**

La industria alimentaria, el sector farmacéutico, las necesidades comerciales de transacciones de productos, así como la necesidad de obtener rápidamente resultados sobre niveles de contaminación microbiológica de ambientes e instalaciones, han favorecido el espectacular desarrollo de los métodos microbiológicos rápidos (Montoro Lorite Antonio, 2019). Un "método rápido" a cualquier método destinado a la detección, el recuento, la caracterización y la subtipificación de microorganismos (patógenos y del deterioro) mediante el cual se obtienen resultados de manera sencilla, fiable y en menor tiempo que con los métodos convencionales. Los métodos rápidos se basan en técnicas físico-químicas (películas de medios de cultivos deshidratados generales o selectivos, sistemas para determinar el número más probable, medios cromogénico y fluorogénico), bioquímicas (galerías miniaturizadas y automatizadas), inmunológicas (precipitación, aglutinación, inmunofluorescencia, citometría, radioinmunoensayo, enzimoimmunoensayo, inmunocromatografía, nefelometría,

inmunomicroscopía) y moleculares (hibridación, PCR de punto final, PCR en tiempo real, ribotipificación, microarrays, biochips) (Leotta, 2009).

## **2.5. Validación de métodos microbiológicos**

Para verificar o validar un método microbiológico, se toma como base una guía de validación de métodos microbiológicos, para posteriormente definir el tipo de método (Normalizado o Normalizado) con la finalidad de establecer los parámetros de validación o verificación (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, 2021).

## **2.6. Parámetros de validación**

### **2.6.1. Límite de detección (LD)**

Es la capacidad de un método microbiológico no normalizado de recuperar con fiabilidad en muestras inoculadas al microorganismo diana a un nivel bajo o bien cantidad o concentración mínima menor a 5 UFC's (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, 2021).

$$LD = \frac{VP}{Ni} \times 100 \%$$

Dónde:

VP= Verdaderos Positivos de muestras inoculadas

Ni = Número total de muestras inoculadas (menor a 5 UFC's)

Criterio de aceptación: Mayor o igual 80%

### **2.6.2. Robustez**

Este parámetro, mide la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. En este sentido el objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio, y describir en qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias), se pueden obtener resultados confiables (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, 2021).

La prueba de robustez de Younden y Steiner, consiste en evaluar un mínimo de cuatro, hasta siete condiciones, de tal forma que sea posible calcular el efecto de cada una de las variables haciendo la media de los cuatro valores, que contienen la variable en su valor más alto y de aquellas que corresponden al valor más bajo. Las variaciones consideradas por el laboratorio deben ser coherentes con el método. Entre las condiciones analíticas que podrían afectar a un método se encuentran: los analistas, equipos, reactivos, pH, temperatura, tiempo de reacción y matriz (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, 2021).

### **2.6.3. Repetibilidad (R)**

Grado de concordancia entre resultados sucesivos e independientes obtenidos por el mismo método empleando un material idéntico bajo las mismas condiciones (aparatos, operadores, laboratorio e intervalos de tiempos cortos, es decir condiciones de Repetibilidad) (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, 2021).

### **2.6.4. Reproducibilidad (r)**

Grado de concordancia entre resultados de análisis individuales en materia de análisis idéntico empleando el mismo método y obtenido por diferentes operadores empleando equipos diferentes (es decir unas condiciones de reproducibilidad). El análisis es realizado por al menos dos personas y se evalúan los criterios de Eficacia relativa, Especificidad relativa y Sensibilidad relativa de forma independiente (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, 2021).

### **2.6.5. Eficacia relativa (ER)**

Este parámetro mide el grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método con las muestras inoculadas y las que no están inoculadas (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, 2021).

$$ER = \left( \frac{VP + VN}{N} \right) \times 100$$

Dónde:

VP= Verdaderos positivos de muestras inoculadas

VN= Verdaderos negativos de muestras inoculadas

N = Número total de muestras

Criterio de Aceptación (CA): Mayor o igual a 95%

### **2.6.6. Especificidad relativa (ES) (Exclusividad)**

Es la capacidad del método para no detectar al microorganismo diana, en un grupo de microorganismos no diana, cuando este no está presente en la muestra (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, 2021).

$$ES = \left( \frac{VN}{Ns} \right) \times 100$$

Dónde:

VN= Verdaderos negativos de muestras inoculadas

Ns= Número total de muestras sin inoculo

Criterio de aceptación: Mayor o igual al 95%

### **2.6.7. Sensibilidad relativa (SR) (Inclusividad)**

Capacidad del método para detectar el microorganismo diana cuando se encuentra presente en la muestra, en una amplia gama de microorganismos no diana (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, 2021).

$$SR = \left( \frac{VP}{Ni} \right) \times 100$$

Dónde:

VP= Verdaderos positivos de muestras inoculadas

Ni = Número total de muestras inoculadas (menor a 5 UFC's)

Criterio de aceptación: Mayor igual al 95%

## **2.7. Método normalizado**

Son aquellos métodos publicados como Normas Oficiales Mexicanas (NOM), Normas Mexicanas (NMX) y los emitidos por organizaciones de normalización, extranjeras, regionales e internacionales; todas reconocidas tales como FDA, USDA, ISO, etc., (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, 2021).

En el caso de un Método Normalizado, el laboratorio debe realizar y presentar evidencia objetiva de la verificación del método para demostrar que cumple las especificaciones de este y cuenta con la competencia técnica para realizarlo adecuadamente, tomando en consideración sus propias instalaciones, equipo y personal, los Criterios considerados para la verificación de un Método Normalizado son los siguientes (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, 2021):

1. Eficacia relativa
2. Especificidad relativa
3. Sensibilidad relativa

## **2.8. Método no normalizado**

Los métodos no normalizados, son aquellos propios o desarrollados en laboratorio, o bien obtenidos de publicaciones científicas, así como métodos normalizados modificado, ampliados o usados fuera de su alcance propuesto. Estos métodos No Normalizados deberán ser verificados por los métodos de referencia Normalizado o Confirmatorio, para poder emitir resultados confiables y demostrar que el método es equivalente al método normalizado, por ende el laboratorio debe realizar y presentar evidencia objetiva de la validación del método para demostrar que el método es capaz de detectar el microorganismo de interés, los criterios considerados en la validación de métodos No Normalizados son los siguientes (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes, 2021):

1. Límite de detección
2. Repetibilidad
3. Reproducibilidad

4. Eficacia relativa
5. Especificidad relativa
6. Sensibilidad relativa
7. Robustez

## **2.9. Agricultura Orgánica**

Sistema de producción de alimentos tanto frescos como procesados derivados de plantas y animales que utiliza insumos naturales y prácticas especiales como la aplicación de compostas y abonos verdes, asociación y rotación de cultivos, uso de repelentes y fungicidas a base de plantas y minerales entre otras. A cambio prohíbe el uso de productos de síntesis química como pesticidas, insecticidas, herbicidas, hormonas, fertilizantes y reguladores de crecimiento en plantas y animales, así como edulcorantes y conservadores sintéticos en los productos transformados, que pueden causar contaminación de alimentos o del ecosistema (Salazar Enrique, Trejo Héctor, Orona Ignacio, López José, Fortis Manuel, Flores Arnoldo, Sánchez Francisco, Léos Juan, 2007).

## **2.10. Características de la agricultura orgánica**

Producir alimentos de alta calidad nutritiva y en suficiente cantidad, garantizar al consumidor el suministro de alimentos libres de contaminantes, aprovechar racionalmente los recursos naturales en el ámbito local reduciendo al mínimo la dependencia externa, evitar todas las formas de contaminación que puedan resultar de la técnica agrícola, reducir al mínimo el uso de energía en la producción agrícola y pecuaria, y el mantener la diversidad genética de los sistemas agrícolas y pecuarios, son algunas de las características de la agricultura orgánica (Salazar Enrique, *et al*, 2007).

## **2.11. Producción orgánica en México**

En México se produce una gran variedad de alimentos de origen orgánico entre los que se encuentran: café, hierbas, hortalizas, cacao y uva, como los principales productos orgánicos en México. El café es por mucho el principal producto orgánico que se cultiva en nuestro país, absorbiendo el 68% de las hectáreas de cultivo (Salazar Enrique, *et al*, 2007).

## **2.12. Composta**

Es el producto obtenido mediante una tecnología llamada compostaje, la cual participan microorganismos aerobios, anaerobios y facultativos donde realizan procesos microbiológicos complejos en presencia o ausencia de oxígeno donde se aprovecha el nitrógeno (N) y el carbono (C) presentes para producir su propia biomasa (Román Pilar, Martínez María M., 2013), que con la adecuada humedad y temperatura, se asegura una transformación higiénica en las diferentes etapas termofílicas y mesofílicas, que permiten obtener un producto benéfico para el suelo e inocuo para el ambiente, que cumplen con las normas de calidad (Secretaria del Medio Ambiente, 2006).

## **2.13. Compostas como productos en la agricultura orgánica**

Dentro de los abonos orgánicos utilizados en la agricultura, el compost y el lombricompost tienen la particularidad de ser materiales procesados, que brindan la capacidad de mejorar la estructura del suelo, liberar nutrientes orgánicos, de incrementar la capacidad de intercambio catiónico, restablecer poblaciones microbianas y aumentar la retención de agua mejorando la calidad del suelo y por ende los bienes y servicios que este presta, trayendo como resultado la disminución de desventajas que puedan tener la aplicación de otros tipos de abonos orgánicos que, por su alta carga microbiana y en particular, de especies patógenas para las plantas, la fauna y el hombre, pueden causar problemas colaterales (Salazar Enrique, *et al*, 2007).

Al incorporar compost al suelo, hay mecanismos subyacentes que traen como resultado la capacidad de degradación de ciertos compuestos, muchos trabajos han centrado su atención sobre la identificación de microorganismos (hongos, bacterias y actinomicetos) que están presentes en el compost y han identificado o determinado su capacidad de degradación. Esto también se ha hecho con el objetivo de establecer la presencia de patógenos de plantas y animales, con el fin de darle un manejo adecuado a los residuos compostados y de llegar a establecer normas de calidad de dichos productos. En este caso se deben tener en cuenta propiedades físicas, químicas y biológicas de los productos para poder establecer una regulación sobre el proceso y sobre las características finales del compost. Mediante siembra en medios de cultivo sintéticos han permitido identificar la carga microbiana que se incorpora al suelo con su aplicación (Salazar Enrique, *et al*, 2007).

## **2.14. Lixiviados**

Es el líquido residual generado por la descomposición biológica de la parte orgánica o biodegradable de los residuos sólidos bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas y/o como resultado de la percolación de agua a través de los residuos en proceso de degradación que contiene sustancias que pueden infiltrarse en los suelos o escurrirse fuera de los sitios en los que se depositan los residuos y que puede dar lugar a la contaminación del suelo y de cuerpos de agua, provocando su deterioro y representar un riesgo potencial a la salud humana y de los demás organismos vivos, siempre y cuando estos presenten una concentración igual o mayor a los 20,000 mg O<sub>2</sub>/L (Demanda bioquímica de Oxígeno al quinto día) (Secretaria del Medio Ambiente, 2006).

Los lixiviados de vermicompost son abonos líquidos que contienen nutrientes, microorganismos benéficos, ácidos húmicos y sustancias antimicrobianas que se han usado principalmente como fertilizantes orgánicos en diferentes cultivos y en el combate de algunas plagas y enfermedades de plantas, se aplican por aspersión foliar o al suelo (Zamora Karen, Castro Leida, Wang Amy, Luis Arauz, 2017).

Este lixiviado se generan durante el proceso de vermicompostaje producto de la transformación de la materia orgánica al ser mezclada e ingerida por la lombriz, este material es drenado y recolectado para evitar la saturación de las camas. Los lixiviados se deben diluir al menos al 50% antes de aplicarlos ya que pueden causar problemas de toxicidad por el alto contenido de sales (Zamora Karen, *et al*, 2017).

## **2.15. Agentes patógenos**

Un agente patógeno es cualquier agente infeccioso que causa enfermedad, invade un huésped para obtener refugio o alimentación, o para reproducirse, de manera que puedan sobrevivir para infectar otros huéspedes. Los agentes patógenos más pequeños son los virus, que usan la maquinaria de las células del huésped para reproducirse, les siguen en tamaño las bacterias, los hongos y los protozoos unicelulares; algunos viven fuera de las células, y otros de preferencia viven dentro de ellas. Los parásitos más grandes son metazoos multicelulares que son demasiado grandes como para invadir células, pero que pueden vivir en cavidades corporales, como los gusanos intestinales (Dr. G. Gordon MacPherson y Prof. Jonathan M. Austyn, 2013).

## 2.16. Contaminantes patógenos en composta y lixiviados

En las Compostas y su producto secundario Lixiviados puede encontrarse bacterias patógenas para humanos y animales, uno de los problemas que se presentan por el uso de Compostas y su producto secundario los Lixiviados, siendo de especial interés la presencia de *Salmonella* spp. Este microorganismo es uno de los principales agentes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y puede ser habitante normal del tracto digestivo de animales que incluyen aves (siendo el pollo un importante reservorio), bovinos, porcino entre otros. Igualmente es de interés *E. coli* O157:H7, que se ha asociado enfermedades causadas por consumo de frutas y vegetales crudos o sus productos no pasteurizados. Tiene como reservorios animales como el ganado vacuno, ciervos y ovejas, y puede sobrevivir hasta 70 días en el estiércol, dependiendo de la concentración y la temperatura. Otros patógenos que se han encontrado en compost y que podrían llegar al hombre por el consumo de alimentos contaminados incluyen: *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Cryptosporidium parvum* (Román Pilar, *et al*, 2013).

**Tabla 1.** Temperatura necesaria para la eliminación de algunos patógenos. Fuente: (Román Pilar, *et al*, 2013).

Microorganismo	Temperatura	Tiempo de exposición
<i>Salmonella</i> spp.	55 °C	1 hora
	65 °C	15-20 minutos
<i>Escherichia coli</i>	55 °C	1 hora
	65 °C	15-20 minutos
<i>Brucella abortus</i>	55 °C	1 hora
	62 °C	3 minutos
<i>Parvovirus bovino</i>	55 °C	1 hora
Huevos de <i>Ascaris lumbricoides</i>	55 °C	3 días

**Tabla 2.** Límites Microbiológicos de Tolerancia Según las Diferentes Normas. NMP: Número más probable, UFC= unidades formadoras de colonias, bs= base seca. Fuente: (Román Pilar, *et al*, 2013).

<b>País</b>	<b>Coliformes fecales</b>	<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	<b><i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i></b>	<b>Hongos fitopatógenos</b>
Chile NCh 2880/04	< 1000 (A), < 2000 (B) NMP/g	Ausente en 25 g de producto	-	-
Unión Europea	< 1 x 10 <sup>3</sup> NMP/g	Ausente en 25 g de producto	Ausente en 1 g	Algunos países incluyen <i>Plasmodiophora brasicae</i>
Colombia 5167/04	< 1000 UFC/g enterobacter ias totales	Ausente en 25 g de producto	ND	-
México NTEA- 006-SMA-RS- 2006	< 1000 NMP/g	< 3/g en bs	-	Ausente

### 2.17. Fuentes de contaminación en Compostas y Lixiviados

La técnica de compostaje y al mismo tiempo la obtención de lixiviados, pasan por fases térmicas las cuales son dependientes de una variedad de factores que intervienen y afectan positiva y negativamente, como lo es una adecuada humedad, airear la pila o al realizar el volteo para homogenizar, el tamaño de partícula a compostar, la forma y tamaño de la pila. También debe considerarse la temperatura del lugar y las prácticas de gestión aplicadas en cada caso. Como consecuencia de las elevadas temperaturas alcanzadas, se destruyen las bacterias patógenas y parásitos presentes en los residuos de partida, dándose la higienización del material. Pero podría ocurrir una re-contaminación de estos abonos o fertilizantes debido a varios factores, si la fase

termofílica no alcanza elevadas temperaturas; no se destruirán las bacterias patógenas y parásitos presentes en los residuos de partida, obteniendo una mala higienización del material o inocuidad del compost, por ejemplo: salmonella se elimina a una temperatura necesaria de 55-65 °C con una exposición de 20 minutos hasta 1 hora. Otra manera de contaminación viene por el uso de estiércoles, seguido del uso de aguas contaminadas y de las personas que manipulan, por ejemplo: la utilización de utensilios contaminados con material fresco, como una pala para el volteo, o añadiendo material fresco después de la fase termófila (Román Pilar, *et al*, 2013).

### **2.18. Salmonella spp.**

La bacteria *salmonella* es un bacilo gramnegativo, intracelular facultativo, lábil en ácido, móvil por flagelos peritricos que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y son un patógeno médicamente importante tanto para humanos como para animales. Las salmonelas forman un grupo complejo de bacterias que consta de dos especies y seis subespecies e incluyen más de 2.579 serovares. Actualmente se reconocen dos especies en el género Salmonella, *S. enterica* y *S. bongori*. *S. enterica* se puede subdividir en las subespecies enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae e indica basadas en modificaciones bioquímicas y genómicas. La mayoría de las Salmonella son fermentadores de lactosa, productores de sulfito de hidrógeno, oxidasa negativa y catalasa positiva. Otras propiedades bioquímicas que permiten la identificación de Salmonella incluyen la capacidad de crecer con citrato como única fuente de carbono, descarboxila lisina e hidroliza urea (Andino & Hanning, 2015).

### **2.19. Epidemiología**

En el año 2010 el Instituto Internacional de Vacunas estimó que hubo 11,9 millones de enfermedades por fiebre tifoidea y 129.000 muertes en países de ingresos bajos y medios. La fiebre tifoidea y fiebre entérica es una de las enfermedades bacterianas provocadas por Salmonella (Crump John, Sjölund Karlsson Maria & Gordon Melita, Parry Christopher, 2015).

Las enfermedades por Salmonella como lo pueden ser fiebre tifoidea y entérica, se ha sabido que en los países de altos ingresos generalmente se adquieren en el extranjero y se asocia con viajes a áreas de endemicidad. En el caso de los países industrializados los productos alimenticios contaminados con heces animales o bien el contacto o

entorno con animales como reptiles, la transmisión a través del agua y entre personas son fuentes importantes de infección por *Salmonella* tifoidea y no tifoidea. En los países de ingresos bajos y medios la infección por *Salmonella* se da por un saneamiento deficiente y falta de acceso a alimentos y agua seguros como en África Subsahariana y en los países de Asia (Crump John, *et al*, 2015).

Entre los años 2003 y 2005 en México Zaidi y colaboradores, colectaron un total de 2,893 muestras fecales de pacientes con diarrea, 5,334 muestras de carne de pollo, puerco y res, y 1,882 muestras de intestinos de pollo, cerdo y bovino en rastros, con el objetivo de obtener mayor información sobre la transmisión de *Salmonella* a través de la cadena alimenticia, se obtuvo como resultado; el aislamiento de *Salmonella no-Typhi* en 12.8% de los pacientes con diarrea. Las dos serovariedades más frecuentes en estos últimos fueron Typhimurium (22.2%) y Enteritidis (14.5%). La primera se encontró en los tres tipos de animales y sus carnes crudas, siendo el cerdo el reservorio principal (10.2% de todas las serovariedades aisladas en este animal), seguido por bovino (6.8%) y pollo (4.6%). *S. Enteritidis* se aisló casi exclusivamente de pollo (11.9% de todas las serovariedades aisladas en este animal); en bovino y cerdo, el aislamiento de esta serovariedad apenas alcanzó el 0.1%, estos resultados indican que *Salmonella* entérica continua siendo una importante causa de morbimortalidad en México. *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* son las serovariedades más frecuentemente aislados de niños con diarrea; además, junto con *S. Typhi*, han sido causa de sepsis y meningitis fatales (Zaidi, *et al*, 2006).

## **2.20. Método para el aislamiento de *Salmonella* spp.**

Los miembros del género *Salmonella* spp han sido muy estudiados como patógenos por su presencia en los alimentos. El control de este microorganismo depende en cierta medida del método analítico utilizado para su detección (Diario Oficial de la Federación, 2020).

El método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp, guiado en la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Apéndice A; se aplica en la detección de *Salmonella* spp en productos para consumo humano, así como de áreas de producción y manejo de alimentos especialmente en productos donde las condiciones ambientales

permiten la contaminación de estos productos por microorganismos de la familia Enterobacteriaceae (Diario Oficial de la Federación, 2020).

En la Norma Oficial Mexicana 210, apéndice A marca que la determinación de la presencia o ausencia de *Salmonella* spp en cierta cantidad de masa o volumen específico de producto, se lleva a cabo requiriendo 4 etapas sucesivas, las cuales son:

1. Etapa de pre-enriquecimiento
2. Enriquecimiento selectivo
3. Aislamiento en medios de cultivos selectivos y diferenciales
4. Identificación bioquímica y confirmación serológica de los microorganismos.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación del experimento

El desarrollo de este experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Inocuidad Agroalimentaria, perteneciente al Centro Internacional de Servicios Fitosanitarios S.A. De C.V., localizado en la Colonia Zona Centro, Calle Prol. Urdiñola, 25000 Saltillo Coahuila, México, con una latitud de 25,4168652 y Longitud: -100,9860915, al Noreste de la Ciudad.

#### 3.2. Requerimientos usados

##### 3.2.1. Equipo utilizado

Balanza de precisión con sensibilidad de 0.01 g

Autoclave que alcance una temperatura mínima de  $121 \pm 1.0$  °C

Incubadora a  $36 \pm 1$  °C

Incubadora a  $41.5 \pm 1$  °C

Cabina de Bioseguridad

Homogeneizador

Contador de colonias

Vórtex

Micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L

Micropipeta de 20 a 200  $\mu$ L

Potenciómetro

### **3.2.2. Materiales**

El material utilizado, los cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas etc., fueron previamente esterilizados durante 15 min a 121°C.

Asas bacteriológicas

Placas Petri desechables

Bolsas estériles para homogeneizador WHIRL-PAK®

Tubos de ensayo con tapa roscada de 16 × 150 mm

Tubos de ensayo con tapa roscada de 13 × 100 mm

Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL

Puntas para micropipetas de 100 y 1000 µL

Papel indicador de pH

Tijeras de punta recta

Gradillas para tubos de ensayo de plástico

Guantes estériles

Cuchillos

Cucharas

### **3.2.3. Reactivos**

Antisuero Salmonella Poly A-I Vi

Novobiocina (sal sódica)

Galerías API 20E

Reactivos para API 20 E

Oxidasa

Cristal violeta

Safranina

Yodo

Alcohol-acetona

Solución yodo yoduro

Solución salina

### 3.2.4. Medios de cultivo

Agua peptonada amortiguada (APAm)

Caldo lactosado

Caldo rappaport vassiliadis soya (RVS)

Caldo muller-kauffmann con verde brillante y novobiocina (MKTTn)

Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

Agar verde brillante (AVB)

Agar sulfito de bismuto (ASB)

Agar hierro triple azúcar (TSI)

Agar hierro lisina (LIA)

Agar cuenta estándar (ACE)

### 3.2.5. Material de referencia

En el análisis se utilizaron las siguientes cepas que se muestran en la Tabla 3. Además de los cultivos control positivo *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, se usaron controles adicionales para ayudar a la selección de colonias atípicas: *S. diarizonae* (ATCC 12325) lactosa positivo y *S. bispebjerg* (ATCC 9842), lactosa-negativo.

**Tabla 3.** Cepas de referencia para determinar en composta y lixiviado.

<i>Microorganismos</i>	<i>Uso</i>
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Control positivo
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Control negativo

### 3.2.6. Método de ensayo

En la Figura 1 se muestra el diagrama de flujo para determinar *Salmonella* spp.

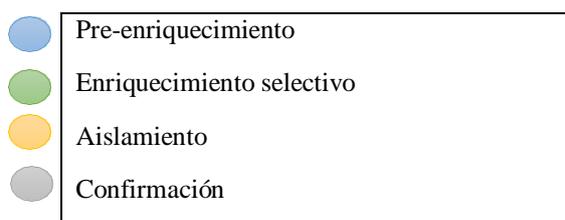
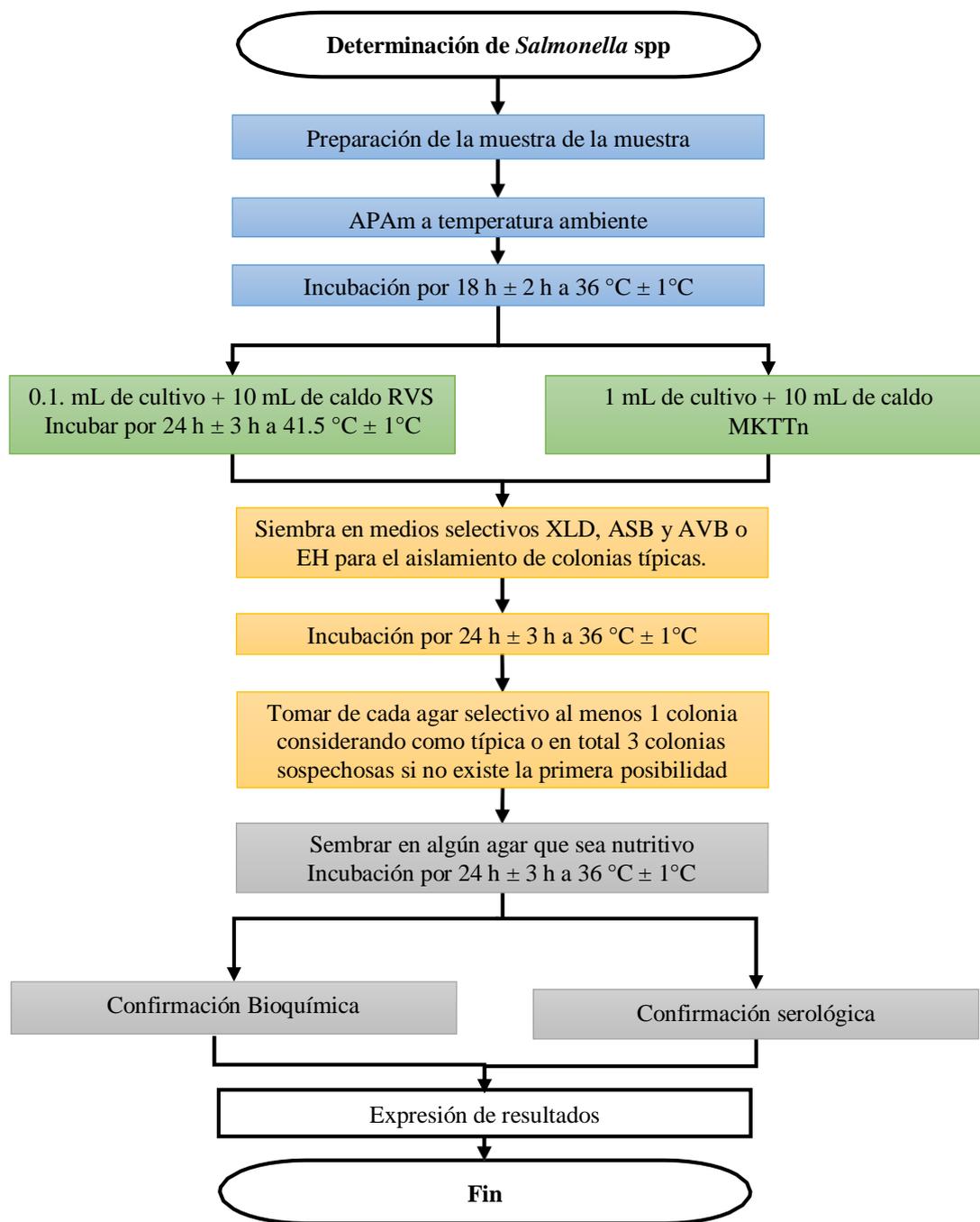


Figura 1. Flujograma, determinación de *Salmonella* Spp.

### 3.3. Expresión de resultados

#### 3.3.1. Validación del método para *Salmonella* spp.

El diseño experimental se realizó de acuerdo con el procedimiento técnico para el aislamiento de *Salmonella* spp. basado en la NOM-210-SSA1-2014, apéndice A, y la guía de validación de métodos microbiológicos, emitida por el SENASICA, determinándose el límite de detección, robustez, repetibilidad, reproducibilidad, eficacia relativa, especificidad relativa, sensibilidad relativa. La evaluación fue realizada por dos analistas como se indica en la tabla 4.

Al determinarse que las matrices se encontraban libres del patógeno de interés se procedió a la preparación y fortificación de las muestras con el microorganismo de interés de acuerdo con los parámetros evaluados (tabla 5), para identificar las características de los controles positivos y negativos en cada uno de los pasos del método de prueba (tabla 6).

**Tabla 4.** Participantes en la validación

Nombre	Puesto
Elvira Alejandra Escalante Reyna	Analista 1
Melbys López López	Analista 2

**Tabla 5.** Descripción general de las matrices

Matriz	Cantidad utilizada	Código interno (Id)	Origen de Matriz
Composta (Gallinaza)	25 g	CM	Muestra llegada para análisis en laboratorio
Lixiviado	25 g	LM	Muestra llegada para análisis en laboratorio

**Tabla 6.** Características generales de los microorganismos controles

Medios de cultivo	Características <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028
XLD	Colonias rosas, con centro negro
AVB	Colonias incoloras rosas, transparentes u opacas, medio rosado a rojo
ASB	Colonias negras con brillo metálico, oscurecimiento en el medio
TSI	A/K, g (+), H2S (+)
LIA	K/K, g (-), H2S (+)
Oxidasa	Negativa
Aglutinación	Positiva
API	Combinación: 6-7-0-4-7-5-2, muy buena identificación 99.8 %
Medios de cultivo	Características <i>Salmonella bisperrjerg</i> ATCC 9842
XLD	Colonias rosas
AVB	Colonias rosas
ASB	Colonias con centro negro
TSI	A/K g(+) H2S(-)
LIA	K/K, g (-), H2S (-)
Oxidasa	Negativa
Aglutinación	Positiva
API	Combinación: 0-1-0-4-5-1-2, buena identificación 91.7 %
Medios de cultivo	Características <i>Salmonella diarizonae</i> ATCC 12325
XLD	Colonias Amarillas con centro negro
AVB	Colonias rosas
ASB	Colonias centro negro brillo metálico
TSI	A/A g (+) H2S (+)
LIA	K/K g (-) H2S (+)
Oxidasa	Negativa
Aglutinación	Negativa
API	Combinación: 7-7-0-4-5-5-2, muy buena identificación 99.7 %
Medios de cultivo	Características <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
XLD	Colonias Amarillas
AVB	Colonias Amarillas
ASB	Sin Crecimiento
TSI	A/A g(+) H2S (-)
LIA	K/K g(+/-) H2S (-)
Oxidasa	Negativa
Aglutinación	Negativa
API	Combinación: 5-1-4-4-1-5-2, Buena Identificación 97.7 %

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos, 2022

### 3.4. Descripción del método de ensayo

#### 3.4.1. Pre-enriquecimiento

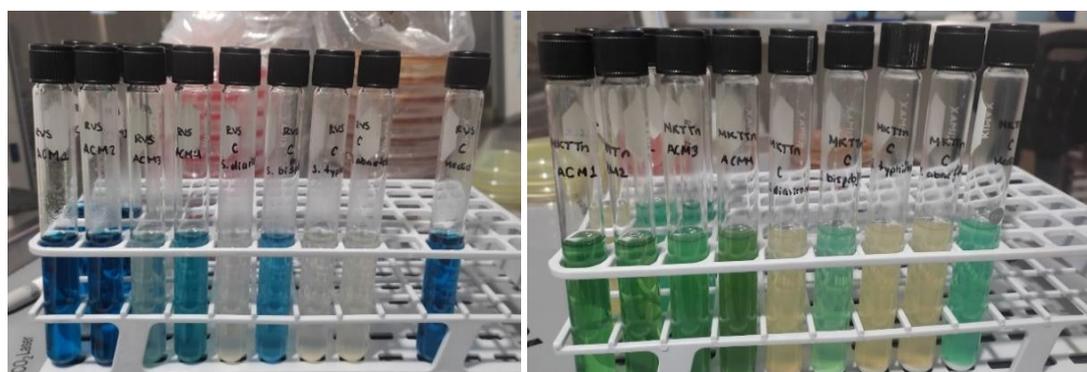
Se muestrearon 25 g cada una de las matrices de Composta (gallinaza) y Lixiviados (humus de lombriz) en bolsas Whirl-pack, de acuerdo con las especificaciones de los parámetros evaluados, se pre-enriquecieron con 225 ml de APAm y se incubaron a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $18\text{h} \pm 2\text{h}$  (Figura 2).



**Figura 2.** Pre-enriquecimiento de las muestras con APAm.

#### 3.4.2. Enriquecimiento

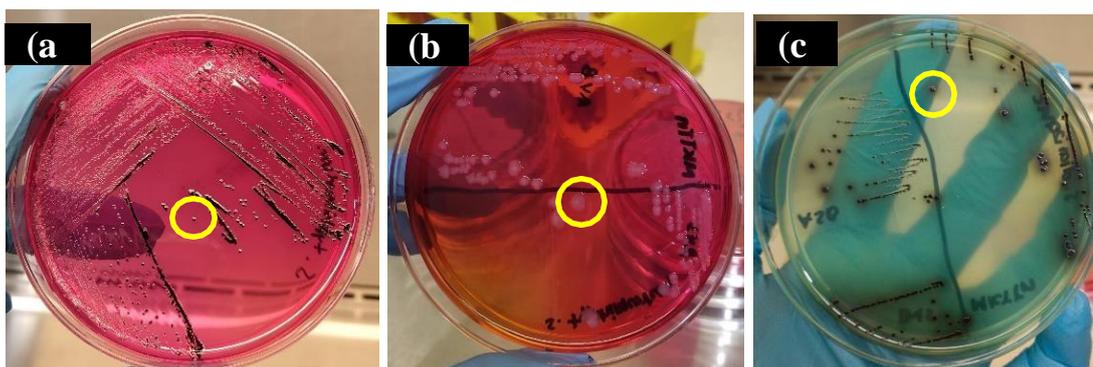
Después de la incubación se tomó 0.1ml de cada muestra y control, transfiriéndose a un tubo con 10 mL de caldo RVS, posteriormente se transfirió 1 mL de cada muestra a un tubo con 10 mL de caldo MKTTn. El caldo RVS se incubó a  $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\text{h} \pm 3\text{h}$  y el caldo MKTTn a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ . (Figura 3).



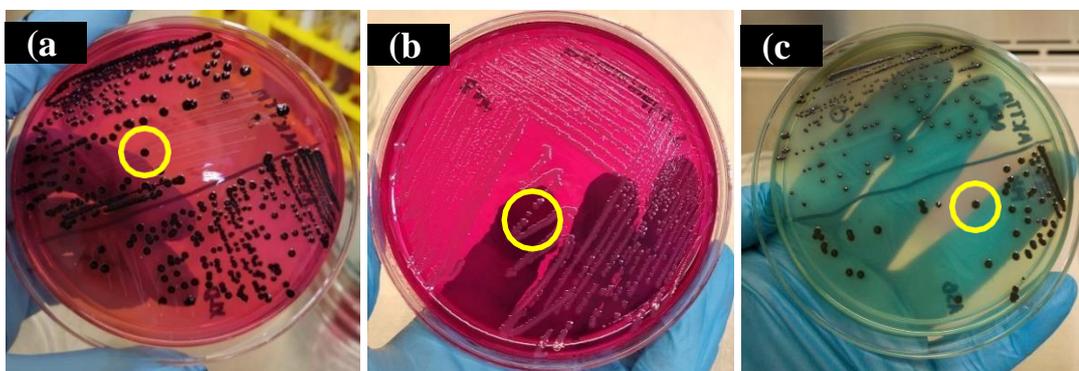
**Figura 3.** Enriquecimiento en caldo RVS (izquierda) y caldo MKTTn (derecha).

### 3.4.3. Aislamiento e identificación

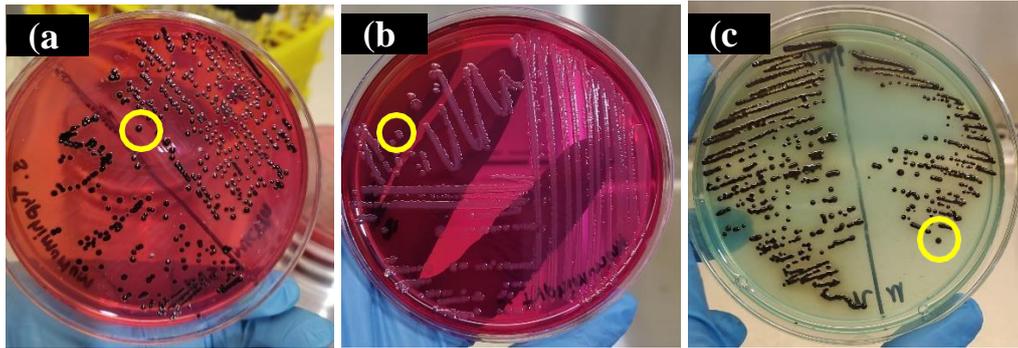
Para el aislamiento, se tomó una asada bacteriológica del caldo RVS y caldo MKTTn de cada una de las muestras y controles, e inocularon por estría simple en Agares Selectivos XLD, AVB y ASB. Los agares selectivos XLD, AVB y ASB se llevaron a incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ ; sin embargo, el ASB se incubó por otras 24 h, para la identificación de *Salmonella* spp., los resultados se muestran de la Figura 4 a la 9.



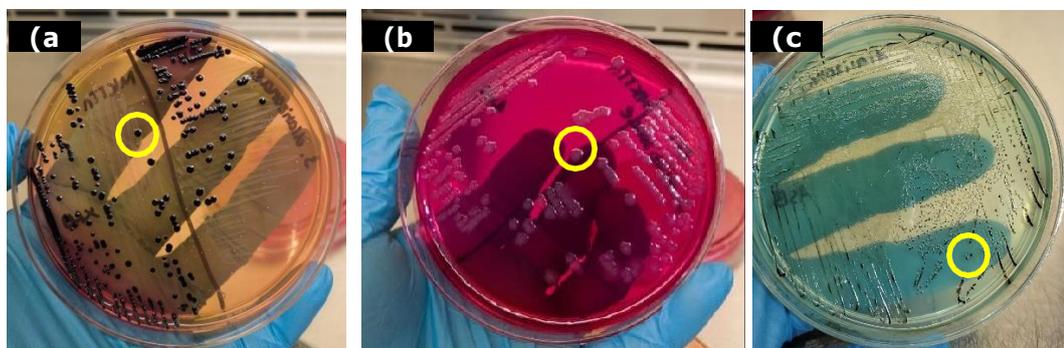
**Figura 4.** Aislamiento en Agares selectivos de muestras de Compostas: a) XLD: colonias rosas con centro negro, b) AVB: colonias incoloras rosas y c) ASB: colonias negras con brillo metálico y oscurecimiento en el medio.



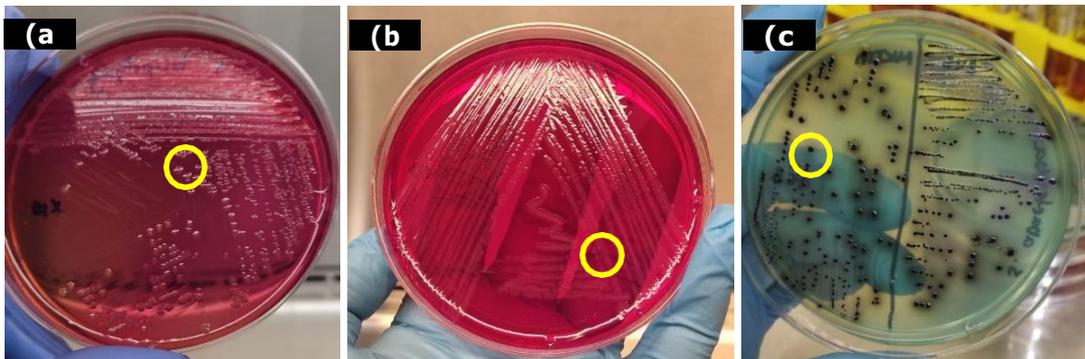
**Figura 5.** Aislamiento en Agares selectivos de muestras de Lixiviados: a) XLD: colonias rosas con centro negro, b) AVB: colonias incoloras rosas, y c) ASB: colonias negras con brillo metálico con oscurecimiento en el medio, considerando con estas características obtenidas el alcance del método en esta matriz.



**Figura 6.** Aislamiento en Agares selectivos de *Salmonella typhimurium*: a) XLD: colonias rosas con centro negro, b) AVB colonias incoloras rosas, transparentes, medio rosado, c) ASB colonias negras con brillo metálico, oscurecimiento en el medio. |



**Figura 7.** Aislamiento en Agares selectivos de *Salmonella diarizonae*: a) XLD colonias amarillas con centro negro, b) AVB colonias rosas, c) ASB colonias centro negro brillo metálico.



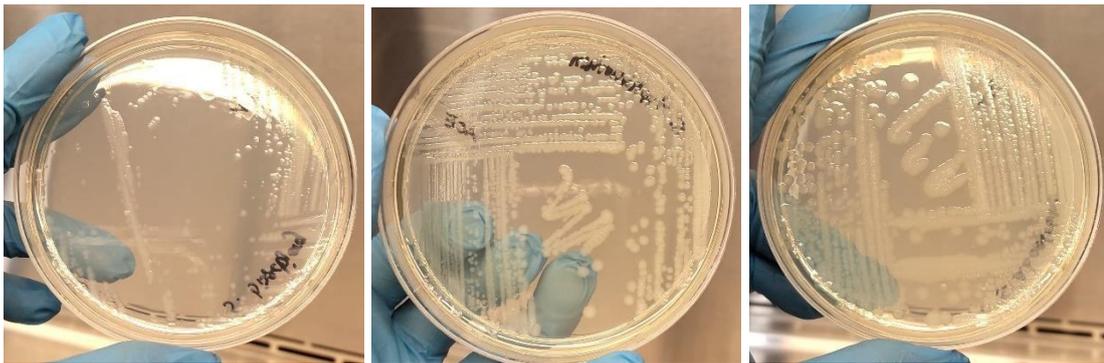
**Figura 8.** Aislamiento en Agares selectivos de *Salmonella bispebjerg*: a) XLD colonias rosas b) AVB colonias rosas, c) ASB colonias negras brillo metálico.



**Figura 9.** Aislamiento selectivo de *Escherichia coli*: a) XLD colonias amarillas, b) AVB colonias amarillas, c) ASB no se presentó crecimiento.

#### 3.4.4. Selección de colonias para su confirmación

Para la confirmación, se tomó de cada agar selectivo una colonia considerada como típica, se estrió en ACE, para el aislamiento de colonias. Por último se incubaron a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ . (Figura 10).



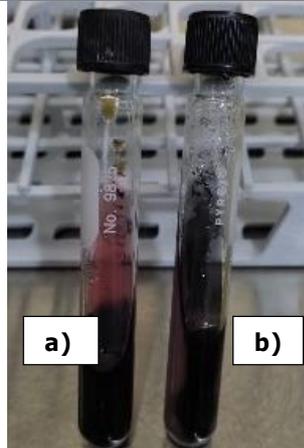
**Figura 10.** Crecimiento de las colonias seleccionadas en placas de ACE.

#### 3.4.5. Confirmación bioquímica

Se seleccionó una colonia de cada placa de ACE, tocando ligeramente el centro con un asa estéril para inocular por punción y estriado por la superficie inclinada de los medios bioquímicos de TSI y LIA, las inclinaciones se incubaron a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 2\text{h}$  (Tabla7). Las placas de agar selectivas seleccionadas se almacenaron a  $5-8^{\circ}\text{C}$ .

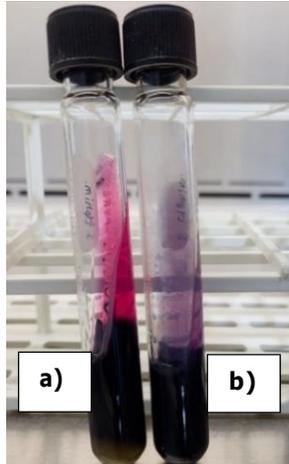
**Tabla 7.** Identificación bioquímica de controles y muestras de compostas y lixiviados.

*Lecturas*



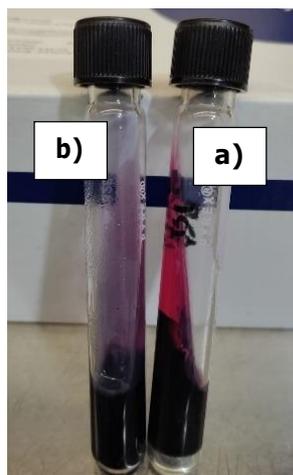
Identificación bioquímica de lixiviados en:

- a) TSI: A/K, g (+), H<sub>2</sub>S (+).
- b) LIA: K/K, g (-), H<sub>2</sub>S (+).



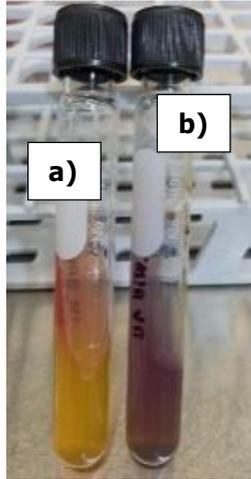
Identificación bioquímica de composta en:

- a) TSI: A/K, g (+), H<sub>2</sub>S (+).
- b) LIA: K/K, g (-), H<sub>2</sub>S (+).



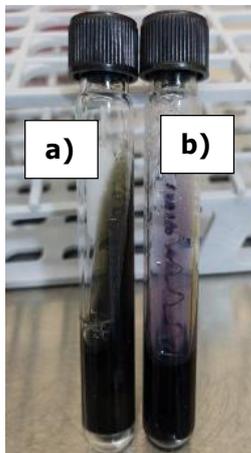
Identificación Bioquímica de control *Salmonella typhimurium* en:

- a) TSI: A/K, g (+), H<sub>2</sub>S (+).
- b) LIA: K/K, g (-), H<sub>2</sub>S (+).



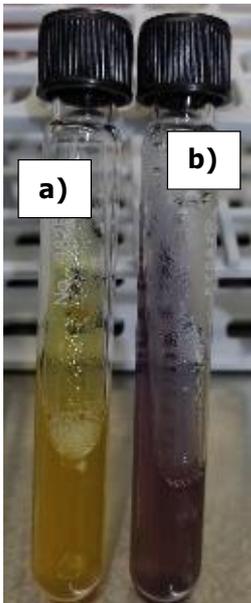
Identificación Bioquímica de control  
*Salmonella bispebjerg* en:

- a) TSI: A/K, g (+), H<sub>2</sub>S (-).
- b) LIA: K/K, g (-), H<sub>2</sub>S (-).



Identificación Bioquímica de control  
*Salmonella diarizonae* en:

- a) TSI: A/A g (+) H<sub>2</sub>S (+).
- b) LIA: K/K g (-) H<sub>2</sub>S (+).



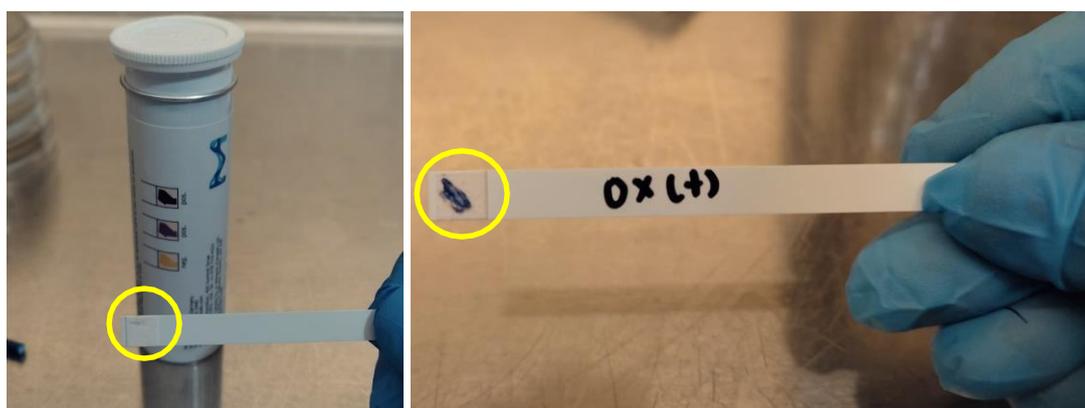
Identificación Bioquímica de control  
*Escherichia coli* en:

- a) TSI: A/A, g (+), H<sub>2</sub>S (-).
- b) LIA: K/K, g (-), H<sub>2</sub>S (-).

Nota: a= ácido, k = alcalino, g (+) = formación de gas, g (-) = sin formación de gas, H<sub>2</sub>S (+) = ácido sulfhídrico positivo, H<sub>2</sub>S (-) = ácido sulfhídrico negativo

### 3.4.6. Prueba oxidasa

La prueba de oxidasa permitió brindar uno de los alcances para la identificación fenotípica de los controles de *Salmonella* spp. y *E. coli*. (Figura 11). Esta prueba determina si un microorganismo produce la enzima citocromooxidasa. La citocromooxidasa es un enzima del grupo de la porfirina férrica muy difundida en la naturaleza. Ella oxida el citocromo c reducido y entonces se transforma ella misma en la forma reducida e inactiva. Por transferencia de los electrones a oxígeno molecular la citocromooxidasa se transforma de nuevo en la forma activa. En presencia de oxígeno molecular el sistema citocromooxidasa/citocromo c puede reducir toda una serie de sustancias orgánicas, entre otras el llamado reactivo NaDi (1-naftol + dimetilparafenilendiamina con formación de la molécula de condensación, azul de indofenol. Esta reacción se emplea para clasificar e identificar bacterias gramnegativas (Merck, 2007).

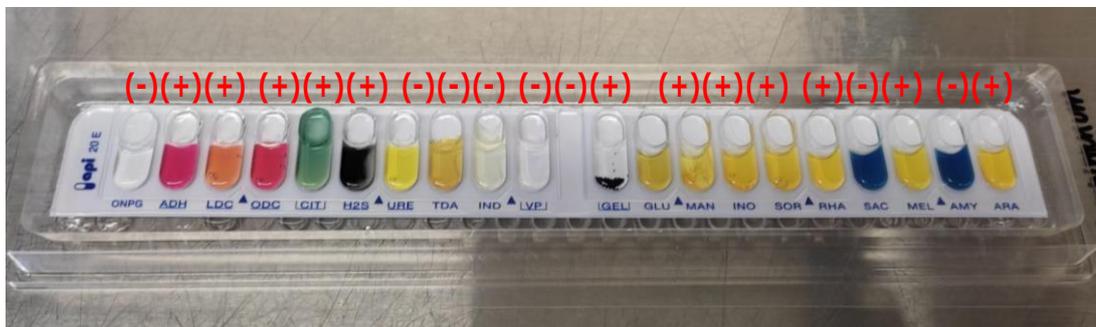


**Figura 11.** La reacción de oxidasa se realizó con *Salmonella typhimurium*, obteniendo resultado de citocromooxidasa-negativo. Para un ensayo de control de un cultivo positivo se utilizó *Vibrio cholerae* ATCC 1408 obteniendo lecturas de oxidasa-positivos con una zona reactiva de color azul a violeta azulado.

### 3.4.7. Identificación presuntiva del género *Salmonella* spp.

Para la confirmación bioquímica se utilizaron galerías API 20 E por muestra y controles, según las instrucciones del fabricante (Figura 12).

Las galerías API 20-E, son pruebas bioquímicas miniaturizadas, los reactivos utilizados fueron reactivo TDA, reactivo James, reactivo VP1 y VP2, SRF, aceite de inmersión y agua destilada.



**Figura 12.** Identificación presuntiva del género *Salmonella* spp., en muestra de composta. Según los datos registrados en API web, se identifica una *Salmonella* spp., con una % ID 99.8, calificando como una muy buena identificación.

### 3.4.8. Detección de los antígenos Poly A-I & Vi

La reacción de aglutinación en las muestras de composta y lixiviado inoculados con *Salmonella* spp. (Figura 13) dio una aglutinación homologa positiva, siendo estos resultados de apoyo para la identificación morfológica y bioquímica del microorganismo de interés.



**Figura 13.** Detección de los antígenos Poly A-I & Vi en muestras de composta y lixiviado. Se usó *Salmonella* O Antiserum poli A-I & Vi, se emulsiono una asada el microorganismo del cultivo aislado de las muestras en un porta objetos y se adiciono el antisuero observándose una reacción homologa y rápida de aglutinación positiva entre antígeno y anticuerpo.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Verificación de las muestras

Se realizaron pruebas preliminares para evaluar el cumplimiento en seguridad e higiene de las matrices para descartar que el microorganismo de interés no esté presente. Cada matriz se analizó por triplicado, se utilizaron testigos control, descartándose la presencia del patógeno de interés, como se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Verificación de las tres repeticiones de composta y lixiviados.

Matriz	ID	Tamaño de la unidad de análisis	Resultado
Composta	CM1	25 g	Ausencia
Composta	CM2	25 g	Ausencia
Composta	CM3	25 g	Ausencia
Lixiviado	LM1	25 g	Ausencia
Lixiviado	LM1	25 g	Ausencia
Lixiviado	LM1	25 g	Ausencia

### 4.2. Límite de detección (LD)

Cada analista realizó 10 repeticiones de cada matriz inoculada con un nivel bajo del microorganismo diana.

#### 4.2.1. Cálculo del LD en Composta (Analista 1)

El LD fue calculado con un VP obtenido de 9 muestras inoculadas, sobre un Ni de 10 muestras totales inoculadas teniendo como resultado un LD del 90%, siendo este un valor aceptado según el CA ( $\geq 80\%$ ).

$$LD = \frac{9}{10} \times 100 \%$$

$$LD = 90 \%$$

**Tabla 9.** Límite de detección analista 1 en composta. La asignación de identificación de las muestras: A (Alejandra), C (composta), LD1 (límite de detección seguido del número de repetición de muestra). Las variables Ni: número total de muestras inoculadas, VP: verdaderos positivos de muestras inoculadas, LD: límite de detección, CA: criterio de aceptación.

Muestra	Código	Resultado	Valor esperado	Ni	VP	LD (%)	CA (%)
1	ACLD1	Presencia	Presencia				
2	ACLD2	Presencia	Presencia				
3	ACLD3	Presencia	Presencia				
4	ACLD4	Presencia	Presencia				
5	ACLD5	Presencia	Presencia				
6	ACLD6	Presencia	Presencia	10	9	90	80
7	ACLD7	Presencia	Presencia				
8	ACLD8	Presencia	Presencia				
9	ACLD9	Ausencia	Presencia				
10	ACLD10	Presencia	Presencia				

#### 4.2.2. Calculo del LD en Lixiviado (Analista 1)

El LD fue calculado con un VP obtenido de 10 muestras inoculadas, teniendo como resultado un LD del 100%, siendo este un valor aceptado según el CA ( $\geq 80\%$ ).

$$LD = \frac{10}{10} \times 100 \%$$

$$LD = 100 \%$$

**Tabla 10.** Límite de detección analista 1 en lixiviado. La asignación de identificación de las muestras: A (Alejandra), L (lixiviado), LD1 (límite de detección seguido del número de repetición de muestra). Las variables Ni: número total de muestras inoculadas, VP: verdaderos positivos de muestras inoculadas, LD: límite de detección, CA: criterio de aceptación.

Muestra	Código	Resultado	Valor esperado	Ni	VP	LD (%)	CA (%)
1	ALLD1	Presencia	Presencia				
2	ALLD2	Presencia	Presencia				
3	ALLD3	Presencia	Presencia				
4	ALLD4	Presencia	Presencia				
5	ALLD5	Presencia	Presencia	10	10	100	80
6	ALLD6	Presencia	Presencia				
7	ALLD7	Presencia	Presencia				
8	ALLD8	Presencia	Presencia				
9	ALLD9	Ausencia	Presencia				
10	ALLD10	Presencia	Presencia				

#### 4.2.3. Cálculo del LD en composta (Analista 2)

El LD fue calculado con un VP obtenido de 10 muestras inoculadas, teniendo como resultado un LD del 100%, siendo este un valor aceptado según el CA ( $\geq 80\%$ ).

$$LD = \frac{10}{10} \times 100 \%$$

$$LD = 100 \%$$

**Tabla 11.** Límite de detección analista 2 en composta. La asignación de identificación de las muestras: M (Melbys), C (composta), LD1 (límite de detección seguido del número de repetición de muestra). Las variables Ni: número total de muestras inoculadas, VP: verdaderos positivos de muestras inoculadas, LD: límite de detección, CA: criterio de aceptación.

Muestra	Código	Resultado	Valor esperado	Ni	VP	LD (%)	CA (%)
1	MCLD1	Presencia	Presencia				
2	MCLD2	Presencia	Presencia				
3	MCLD3	Presencia	Presencia				
4	MCLD4	Presencia	Presencia				
5	MCLD5	Presencia	Presencia	10	10	100	80
6	MCLD6	Presencia	Presencia				
7	MCLD7	Presencia	Presencia				
8	MCLD8	Presencia	Presencia				
9	MCLD9	Presencia	Presencia				
10	MCLD10	Presencia	Presencia				

#### 4.2.4. Cálculo del LD en Lixiviado (Analista 2)

El LD fue calculado con un VP obtenido de 10 muestras inoculadas, teniendo como resultado un LD del 100%, siendo este un valor aceptado según el CA ( $\geq 80\%$ ).

$$LD = \frac{10}{10} \times 100 \%$$

$$LD = 100 \%$$

**Tabla 12.** Límite de detección analista 2 en lixiviado. La asignación de identificación de las muestras: M (Melbys), L (lixiviado), LD1 (límite de detección seguido del número de repetición de muestra). Las variables Ni: número total de muestras inoculadas, VP: verdaderos positivos de muestras inoculadas, LD: límite de detección, CA: criterio de aceptación.

Muestra	Código	Resultado	Valor esperado	Ni	VP	LD (%)	CA (%)
1	MLLD1	Presencia	Presencia				
2	MLLD2	Presencia	Presencia				
3	MLLD3	Presencia	Presencia				
4	MLLD4	Presencia	Presencia				
5	MLLD5	Presencia	Presencia				
6	MLLD6	Presencia	Presencia	10	10	100	80
7	MLLD7	Presencia	Presencia				
8	MLLD8	Presencia	Presencia				
9	MLLD9	Presencia	Presencia				
10	MLLD10	Presencia	Presencia				

### 4.3. Robustez

En robustez se consideraron cuatro parámetros a evaluar en muestras inoculadas y no inoculadas, las cuales se llevaron a condiciones normales en su uso hasta sus límites tolerantes, para poder medir la capacidad del método en obtener resultados confiables.

**Tabla 13.** Asignación de valores de condiciones evaluadas para el parámetro robustez en composta y lixiviados. La variable en su valor más alto (A, B, C, D) y aquellas que corresponden al valor más bajo (a, b, c, d).

Condición	Letra	Descripción	Valor Nominal	Valor Alto	Valor Bajo
1	A/a	Medio de cultivo	APAm	APAm	C. Lactosado
2	B/b	Temperatura	36°C	37 °C	35°C
3	C/c	Tiempo	26 h	24 h	18 h
4	D/d	Analista	NA	1	2

### 4.3.1. Criterio de Aceptación

Utilizando los promedios calculados (tabla 13) se obtuvo un promedio de las variables consideradas como valores altos y valores bajos. El Resultado obtenido de cada variable fue igual a 1. En virtud a estos resultados se considera que el método es factible y seguro para obtener resultados confiables.

**Tabla 14.** Robustez analista 1 y 2 (composta). Se llevó a cabo la combinación de valores en 8 bloques de 3 repeticiones cada uno, obteniendo resultados satisfactorios (presencia en las muestras inoculadas, ausencia en muestras no inoculadas). Los resultados obtenidos se reportan como presencia (1) o ausencia (0) por cada bloque, para así obtener el promedio.

Bloque	A/a	B/b	C/c	D/d	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Promedio
1	APAm	37 °C	26 h	Alejandra	1	1	1	1
2	APAm	37 °C	26 h	Alejandra	1	1	1	1
3	C. lactosado	37 °C	26 h	Alejandra	1	1	1	1
4	C. lactosado	37 °C	26 h	Alejandra	1	1	1	1
5	APAm	35°C	18 h	Melbys	1	1	1	1
6	APAm	35°C	18 h	Melbys	1	1	1	1
7	C. lactosado	35°C	18 h	Melbys	1	1	1	1
8	C. lactosado	35°C	18 h	Melbys	1	1	1	1

**Tabla 15.** Robustez analista 1 y 2 (lixiviado). Se llevó a cabo la combinación de valores en 8 bloques de 3 repeticiones cada uno, obteniendo resultados satisfactorios (presencia en las muestras inoculadas, ausencia en muestras no inoculadas). Los resultados obtenidos se reportan como presencia (1) o ausencia (0) por cada bloque, para así obtener el promedio.

<b>Bloque</b>	<b>A/a</b>	<b>B/b</b>	<b>C/c</b>	<b>D/d</b>	<b>Resultado 1</b>	<b>Resultado 2</b>	<b>Resultado 3</b>	<b>Promedio</b>
1	APAm	37 °C	18 h	Melbys	1	1	1	1
2	APAm	37 °C	26 h	Alejandra	1	1	1	1
3	C. lactosado	37 °C	18 h	Melbys	1	1	1	1
4	C. lactosado	37 °C	26 h	Alejandra	1	1	1	1
5	APAm	35°C	18 h	Melbys	1	1	1	1
6	APAm	35°C	26 h	Alejandra	1	1	1	1
7	C. lactosado	35°C	18 h	Melbys	1	1	1	1
8	C. lactosado	35°C	26 h	Alejandra	1	1	1	1

#### **4.4. Repetibilidad (R)**

En este parámetro se llevaron repeticiones de las matrices de composta y lixiviado a condiciones requeridas inicialmente por el método (respetando los parámetros, aparatos y operadores), para finalmente evaluar la concordancia de resultados evidentes esperados.

**Tabla 16.** Repetibilidad realizada por el analista 2, en Composta. El grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método con las muestras inoculadas y las no inoculadas fue de una eficacia relativa (ER) del 100% en las tres repeticiones, siendo estos valores aceptados. Entendiéndose como VN (verdaderos negativos), VP (verdaderos positivos) y ER (eficacia relativa).

Parámetros	Muestra	Resultado	Repetición 1			Repetición 2			Repetición 3				
			VN	VP	ER	Resultado	VN	VP	ER	Resultado	VN	VP	ER
Especificidad relativa	001	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	002	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	003	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	004	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	005	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	006	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	007	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	008	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	009	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	010	Ausencia	10 de 10	10 de 10	100%	Ausencia	10 de 10	10 de 10	100 %	Ausencia	10 de 10	10 de 10	100 %
Sensibilidad relativa	001	Presencia				Presencia				Presencia			
	002	Presencia				Presencia				Presencia			
	003	Presencia				Presencia				Presencia			
	004	Presencia				Presencia				Presencia			
	005	Presencia				Presencia				Presencia			
	006	Presencia				Presencia				Presencia			
	007	Presencia				Presencia				Presencia			
	008	Presencia				Presencia				Presencia			
	009	Presencia				Presencia				Presencia			
	010	Presencia				Presencia				Presencia			

**Tabla 17.** Repetibilidad realizada por el analista 2, en lixiviado. Entendiéndose como VN (verdaderos negativos), VP (verdaderos positivos) y ER (eficacia Relativa). El grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método con las muestras inoculadas y las no inoculadas fue de una eficacia relativa (ER) del 100% en las tres repeticiones, siendo estos valores aceptados.

Parámetros	Muestra	Resultado	Repetición I			Repetición II			Repetición III				
			VN	VP	ER	Resultado	VN	VP	ER	Resultado	VN	VP	ER
Especificidad relativa	001	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	002	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	003	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	004	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	005	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	006	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	007	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	008	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	009	Ausencia				Ausencia				Ausencia			
	010	Ausencia	10 de 10	10 de 10	100%	Ausencia	10 de 10	10 de 10	100 %	Ausencia	10 de 10	10 de 10	100 %
Sensibilidad relativa	001	Presencia				Presencia				Presencia			
	002	Presencia				Presencia				Presencia			
	003	Presencia				Presencia				Presencia			
	004	Presencia				Presencia				Presencia			
	005	Presencia				Presencia				Presencia			
	006	Presencia				Presencia				Presencia			
	007	Presencia				Presencia				Presencia			
	008	Presencia				Presencia				Presencia			
	009	Presencia				Presencia				Presencia			
	010	Presencia				Presencia				Presencia			

## 4.5. Reproducibilidad

Empleando el mismo método, contemplando a los analistas de la validación, se utilizaron equipos diferentes y avaluó los criterios de eficacia relativa, especificidad relativa y sensibilidad relativa de forma independiente por matriz, obteniéndose como resultado que el método es fiable y selectivo por diferenciar las muestras inoculadas entre un grupo de microorganismo no diana y también el método tiene capacidad para detectar que el microorganismo diana no se encuentra presente en la muestra en una amplia gama de microorganismos no diana.

**Tabla 18.** Reproducibilidad realizada por el analista 1, en composta y lixiviado. Se realizaron 10 repeticiones de muestras inoculadas y no inoculadas con el microorganismo diana por matriz, obteniéndose una eficacia relativa (ER) aceptada del 100 %. Entendiéndose como VN (verdaderos negativos), VP (verdaderos positivos).

Parámetros	Muestra	Resultado	Composta			Lixiviado			
			VN	VP	ER	Resultado	VN	VP	ER
Especificidad relativa	001	Ausencia				Ausencia			
	002	Ausencia				Ausencia			
	003	Ausencia				Ausencia			
	004	Ausencia				Ausencia			
	005	Ausencia				Ausencia			
	006	Ausencia				Ausencia			
	007	Ausencia				Ausencia			
	008	Ausencia				Ausencia			
	009	Ausencia				Ausencia			
	010	Ausencia	10 de 10	10 de 10	100%	Ausencia	10 de 10	10 de 10	100 %
Sensibilidad relativa	001	Presencia				Presencia			
	002	Presencia				Presencia			
	003	Presencia				Presencia			
	004	Presencia				Presencia			
	005	Presencia				Presencia			
	006	Presencia				Presencia			
	007	Presencia				Presencia			
	008	Presencia				Presencia			
	009	Presencia				Presencia			
	010	Presencia				Presencia			

Cálculos para eficacia relativa (ER), especificidad relativa (ES), y sensibilidad relativa (SR):

$$ER = \frac{VP+VN}{N} \times 100 = \frac{10}{10} \times 100 = 100\%$$

$$ES = \frac{VN}{Ns} \times 100 = \frac{10}{10} \times 100 = 100\%$$

$$SR = \frac{VP}{Ni} \times 100 = \frac{10}{10} \times 100 = 100\%$$

**Tabla 19.** Reproducibilidad realizada por el analista 2, en composta y lixiviado. Se llevaron a cabo 10 repeticiones de muestras inoculadas y no inoculadas con el microorganismo diana por matriz, obteniéndose una eficacia relativa (ER) aceptada del 100 %. Entendiéndose como VN (verdaderos negativos), VP (verdaderos positivos).

Parámetros	Muestra	Resultado	Composta			Lixiviado			
			VN	VP	ER	Resultado	VN	VP	ER
Especificidad relativa	001	Ausencia				Ausencia			
	002	Ausencia				Ausencia			
	003	Ausencia				Ausencia			
	004	Ausencia				Ausencia			
	005	Ausencia				Ausencia			
	006	Ausencia				Ausencia			
	007	Ausencia				Ausencia			
	008	Ausencia				Ausencia			
	009	Ausencia				Ausencia			
	010	Ausencia	10 de 10	10 de 10	100%	Ausencia	10 de 10	10 de 10	100 %
Sensibilidad relativa	001	Presencia				Presencia			
	002	Presencia				Presencia			
	003	Presencia				Presencia			
	004	Presencia				Presencia			
	005	Presencia				Presencia			
	006	Presencia				Presencia			
	007	Presencia				Presencia			
	008	Presencia				Presencia			
	009	Presencia				Presencia			
	010	Presencia				Presencia			

#### 4.6. Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros de la validación cumplieron con los rangos de criterios de aceptación como se muestra en la tabla 21. El límite de detección en composta del analista 1 fue el valor más bajo con un 90 %, no obstante este valor está dentro de los rangos aceptables.

**Tabla 20.** Evaluación de los criterios de aceptación.

<b>Parámetro</b>	<b>Criterios de aceptación</b>	<b>Resultados en Composta</b>	<b>Resultados en Lixiviado</b>
<b>Límite de Detección</b>	<b>Resultados positivos:</b> $\geq$ 80%	Analista 1: 90 %	Analista 1: 100 %
	<b>Tamaño del inóculo:</b> < 5 UFC microorganismo de interés	Analista 2: 100 %	Analista 2: 100 %
<b>Robustez</b>	El resultado de cada variable debe ser igual a 1	Analista 1: 1	Analista 1: 1
		Analista 2: 1	Analista 2: 1
<b>Repetibilidad</b>	Mayor o igual 95%	Analista 1: 100%	Analista 1: 100 %
		Analista 2: 100 %	Analista 2: 100 %
<b>Reproducibilidad</b>	Mayor o igual 95%.	Analista 1: 100 %	Analista 1: 100%
		Analista 2: 100 %	Analista 2: 100 %
<b>Eficacia relativa (ER)</b>	Mayor o igual 95%.	Analista 1: 100 %	Analista 1: 100 %
		Analista 2: 100 %	Analista 2: 100 %
<b>Especificidad Relativa (ES)</b>	Mayor o igual 95%.	Analista 1: 100 %	Analista 1: 100 %
		Analista 2: 100 %	Analista 2: 100 %
<b>Sensibilidad Relativa (SR)</b>	Mayor o igual 95%.	Analista 1: 100 %	Analista 1: 100 %
		Analista 2: 100 %	Analista 2: 100 %

## V. CONCLUSIONES

Al cumplirse todos los criterios de validación de métodos microbiológicos como lo son límite de detección, reproducibilidad, repetibilidad, eficacia relativa, especificidad relativa, sensibilidad relativa y robustez, en se ha considerado que el método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp., es suficientemente robusto para no ser afectado por las variaciones reproducibles realizadas en este trabajo y por lo tanto este método es apto para el análisis de productos de composta y lixiviado.

El empleo del método cualitativo “determinación de *Salmonella* spp. ” descrito en la Norma Oficial Mexicana 210, apéndice A, fue una herramienta eficaz para obtener resultados de garantía comparables por su reconocimiento y aceptación, permitiendo que la validación del método aporte en el desarrollo científico y técnico, obteniendo con esto calidad de procesos y resultados en el laboratorio de inocuidad agroalimentaria donde se pretende implementar.

## VI. REFERENCIAS

- Andino, A., & Hanning, I. (2015). Salmonella enterica: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Scientific World Journal*, 1–29. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>
- Arias Palacios, J., Ortiz Gómez, D. S., & González Acero, A. (2013). Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado, elaborado en una industria farmacéutica. *Revista Cubana de Farmacia*, 47(2), 178–184. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152013000200005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152013000200005)
- Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes. (2021). *Guía de Validación de Métodos Microbiológicos*. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/731570/MEC-PR-GVM\\_GU\\_A\\_DE\\_VALIDACION\\_DE\\_M\\_TODOS\\_MICROBIOL\\_GICOS.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/731570/MEC-PR-GVM_GU_A_DE_VALIDACION_DE_M_TODOS_MICROBIOL_GICOS.pdf)
- Crump John, Sjölund Karlsson Maria, & Gordon Melita, Parry Christopher. (2015). Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive Salmonella infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(4), 901–937. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-15>
- Diario Oficial de la Federación. (2020). NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. En *DOF - Diario Oficial de la Federación* (p. 8). [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5284148&fecha=04/01/2013](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284148&fecha=04/01/2013)
- Dr. G. Gordon MacPherson y Prof. Jonathan M. Austyn. (2013). *Inmunología Conceptos y Evidencias* (1 a). <https://booksmedicos.org/inmunologia-conceptos-y-evidencias/>
- Laconte María Corina. (2019). *La importancia de producir compost*, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. <https://inta.gob.ar/noticias/la-importancia-de-producir-compost>
- Leotta, G. A. (2009). Revista argentina de microbiología Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos. *Revista argentina de mrobiología*, 41(2), 22–24.

- Merck. (2007). Bactident Oxidasa. En *Microbiología* (Vol. 5, p. 13300).  
[https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-GT-Site/en\\_US/-/GTQ/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA\\_CHEM-113300&DocumentId=200806.061.ProNet&DocumentType=PI&Language=ES&Country=NF&Origin=PDP#:~:text=Esta reacci3n se emplea para clasificar e identificar bac- terias.&text=Cada vez se examinan las,sus- pens3n espesa de bacterias.](https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-GT-Site/en_US/-/GTQ/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-113300&DocumentId=200806.061.ProNet&DocumentType=PI&Language=ES&Country=NF&Origin=PDP#:~:text=Esta reacci3n se emplea para clasificar e identificar bac- terias.&text=Cada vez se examinan las,sus- pens3n espesa de bacterias.)
- Montoro Lorite Antonio. (2019). *M3todos microbiol3gicos tradicionales frente a los m3todos de detecci3n r3pidos*.  
[https://ddd.uab.cat/pub/poncom/2019/255767/mrama\\_a2019n18r6.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/poncom/2019/255767/mrama_a2019n18r6.pdf)
- Nature portfolio. (2022). *Microbiology techniques*.  
<https://www.nature.com/subjects/microbiology-techniques#:~:text=Microbiology techniques are methods used,identify%2C engineer and manipulate microbes.>
- Organizaci3n Mundial de la Salud. (2020). *Inocuidad de los alimentos*. 1–7.  
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Rodr3guez Diana Marcela, Torres Francy Elaine, Guti3rrez Edna Viviana, L3pez Maritza Paola, M. M. M., & Carrascal Ana Karina. (2008). Determinaci3n de Salmonella typhimurium en compost inoculado artificialmente empleado en un cultivo de lechuga. *Acta Biologica Colombiana*, 13(3), 61–74.  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319028004005>
- Rom3n Pilar, Mart3nez Mar3a M., A. P. (2013). Manual de Compostaje del Agricultor. En *Organizaci3n de las Naciones Unidas para la Alimentaci3n y la Agricultura Oficina Regional para Am3rica Latina y el Caribe*. <http://www.fao.org/3/a-i3388s.pdf>
- Salazar Enrique, Trejo H3ctor, Orona Ignacio, L3pez Jos3, Fortis Manuel, Flores Arnoldo, S3nchez Francisco, L3os Juan, J. F. (2007). Uso y Aprovechamiento de Abonos Org3nicos e Inocuidad. En *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnolog3a*.  
[http://faz.ujed.mx/Posgrado/maos/AUTOEVALUACION/CATEGORIAS/3-PERSONAL\\_ACADEMICO/9.1-LIBROS/9.1.1-LINEA\\_USO\\_Y\\_APROV.\\_DE\\_ABONOS\\_ORG.\\_E\\_INOCUIDAD/LIBRO\\_DE\\_ABONOS\\_2007.pdf](http://faz.ujed.mx/Posgrado/maos/AUTOEVALUACION/CATEGORIAS/3-PERSONAL_ACADEMICO/9.1-LIBROS/9.1.1-LINEA_USO_Y_APROV._DE_ABONOS_ORG._E_INOCUIDAD/LIBRO_DE_ABONOS_2007.pdf)
- Secretaria del Medio Ambiente. (2006). *Norma T3cnica Estatal Ambiental NTEA-006-SMA-RS-2006*. Gaceta del gobierno.  
[https://sma.edomex.gob.mx/sites/sma.edomex.gob.mx/files/files/sma\\_pdf\\_ntea\\_006](https://sma.edomex.gob.mx/sites/sma.edomex.gob.mx/files/files/sma_pdf_ntea_006)

- Tortosa Germán. (2013). *Aplicación Agrícola de los Composts*. Compostando Ciencia. <http://www.compostandociencia.com/2013/05/aplicacion-agricola-de-los-composts-html/>
- Vargas Hoyos Karen, Vidal Arboleda Juana, O.-A. M. (2018). Validación de método cualitativo para detección de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche para diagnóstico de mastitis bovina. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 21(1), 271–275. <https://doi.org/10.31910/rudca.v21.n1.2018.687>
- Zaidi Mussaret, López Constantino, E. C. (2006). Estudios Mexicanos sobre Salmonella: Epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 121–125.
- Zamora Karen, Castro Leida, Wang Amy, Luis Arauz, U. L. (2017). Uso potencial de lixiviados y té de vermicompost en el control del ojo de gallo del café *Mycena citricolor* Potential use of vermicompost leachates and tea in the control of the American leaf spot of coffee *Mycena*. *Universidad de Costa Rica*, 41, 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.15517/rac.v41i1.29747>