

**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.**

DIANA ROCIO VILLALOBOS BARRERA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MANIZALES
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.**

DIANA ROCIO VILLALOBOS BARRERA

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Especialista en Microbiología Industrial**

**Director:
MAGISTER JENNIFER GAVIRIA GIRALDO**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MANIZALES
2015**

Nota de aceptación

Firma de Director del Trabajo de Grado

Firma del presidente del Comité de Programa

Firma de integrante del Comité de Programa

Manizales, 06 Noviembre de 2015

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis Padres por sus consejos, por su ejemplo de responsabilidad, y perseverancia, por el valor mostrado para salir adelante que los caracteriza, por su motivación constante, y todos los demás valores que han desarrollado en mí, los cuales me han permitido ser una persona de bien; pero ante todo, por su amor. A ustedes por siempre mi corazón y reconocimiento

A mis hermanos Jaime y Carlos que siempre han sido para mí un ejemplo a seguir, gracias por su comprensión, su confianza y amor. Gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y estudiante, por estar conmigo y apoyarme siempre. Los quiero mucho y les dedico mi trabajo.

A ti, Edith, mi amada hermana, a pesar de no estar aquí ahora, sé que tu alma me acompaña, te dedico este trabajo porque juntas compartimos gratos momentos y de ti aprendí muchas cosas.

AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo de Investigación es fruto no solo de mi esfuerzo sino del apoyo, sugerencias y estímulo de muchas personas, tanto en lo profesional como en lo personal a quienes quiero expresar mis agradecimientos:

A la Magister JENNIFER GAVIRIA GIRALDO Directora del trabajo de Investigación por todos los conocimientos que aprendí de ella, por su comprensión y por las orientaciones que me dio para realizar este trabajo.

A los PROFESORES que orientaron las diferentes materias de la Especialización por sus enseñanzas las cuales me ayudan a mejorar como profesional.

Al Doctor VÍCTOR COTRINO Director Científico del Laboratorio Médico Veterinario (LMV) quien con sus conocimientos y experiencia me acompañó en la realización práctica del trabajo con sus orientaciones y sugerencias, aportándome valiosas observaciones que me guiaron. Igualmente por permitirme usar las instalaciones y equipos del laboratorio para ejecutar las pruebas para el desarrollo del proyecto.

A mis compañeros de trabajo en el Laboratorio, Johanna, Lina y Enrique, por su colaboración y apoyo, cuando tuve que viajar a mis clases.

A mis compañeras de la Especialización en Microbiología Industrial con las que compartí conocimientos y experiencias, por colaborar conmigo en diferentes oportunidades y por brindarme el afecto necesario para disfrutar de momentos de encuentro académico.

A mis PADRES por su apoyo incondicional en todo lo que me he propuesto, por escucharme y motivarme a seguir adelante en este trabajo a pesar de las dificultades que se presentaron, por estar siempre presentes cuando los he necesitado.

A Dios por haberme permitido llegar a este punto y por darme la salud y las capacidades necesarias para lograr mis objetivos.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCION..... | 10 |
| 2. OBJETIVOS..... | 12 |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL..... | 12 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 12 |
| 3. MARCO TEORICO | 13 |
| 3.1. VALIDACIÓN..... | 13 |
| 3.2. METODOS A VALIDAR..... | 14 |
| 3.2.1. Métodos Normalizados | 14 |
| 3.2.2. Métodos No Normalizados..... | 14 |
| 3.3. TIPOS DE VALIDACION | 14 |
| 3.3.1. Validación Primaria..... | 14 |
| 3.3.2. Validacion Secundaria | 15 |
| 3.3.3. Validación prospectiva..... | 15 |
| 3.3.4. Validación Retrospectiva | 16 |
| 3.4. PARAMETROS DE VALIDACION..... | 16 |
| 3.4.1. Precision | 16 |
| 3.4.2. Repetibilidad | 16 |
| 3.4.3. Reproducibilidad | 16 |
| 3.4.4. Robustez..... | 16 |
| 3.4.5. Limite De Deteccion..... | 16 |
| 3.4.6. Limite De Cuantificacion | 17 |
| 3.4.7. Especificidad o Selectividad | 17 |
| 3.4.8. Linealidad | 17 |
| 3.4.9. Exactitud | 17 |
| 3.4.10. Sensibilidad | 17 |
| 3.5. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO | 17 |
| 3.5.1. Método de Referencia..... | 17 |
| 3.5.2. Método alternativo | 18 |
| 3.6. <i>Salmonella</i> | 18 |
| 3.7. SALMONELOSIS | 19 |

| | |
|---|----|
| 3.8. PIENSO..... | 19 |
| 3.9. MATERIAS PRIMAS | 20 |
| 3.10. HARINA DE SOYA..... | 20 |
| 3.11. SISTEMA VIDAS PARA LA DETECCION DE <i>Salmonella</i> spp | 21 |
| 4. MATERIALES Y METODOS..... | 22 |
| 4.1. PREPARACION DEL INOCULO MICROBIANO | 23 |
| 4.2. PRUEBA DE VIABILIDAD DE LAS CEPAS | 24 |
| 4.3. PRUEBA DE ESTERILIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO..... | 24 |
| 4.4. CONTAMINACION DE LA MUESTRA | 25 |
| 4.5. CONTROL NEGATIVO DE MUESTRA..... | 26 |
| 4.6. DETECCION DE <i>Salmonella</i> spp EN ALIMENTOS DE CONSUMO ANIMAL POR EL METODO TRADICIONAL..... | 26 |
| 4.6.1. Pre-enriquecimiento en medio liquido no selectivo..... | 27 |
| 4.6.2. Enriquecimiento selectivo | 27 |
| 4.6.3. Siembra en placa..... | 27 |
| 4.7. DETECCION DE <i>Salmonella</i> spp EN ALIMENTOS DE CONSUMO ANIMAL POR EL METODO ALTERNATIVO ELFA USANDO EL EQUIPO MINI VIDAS | 28 |
| 4.7.1. Pre-enriquecimiento en medio liquido no selectivo..... | 29 |
| 4.7.2. Enriquecimiento selectivo | 29 |
| 4.7.3. Montaje de la prueba VIDAS | 30 |
| 4.8. CONFIRMACIÓN | 30 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSION | 32 |
| 5.1. Revisión del inoculo microbiano..... | 32 |
| 5.2. Prueba de viabilidad de las cepas..... | 33 |
| 5.3. Prueba de esterilidad de los medios de cultivo | 33 |
| 5.4. Resultados detección de <i>Salmonella</i> spp por el método tradicional..... | 34 |
| 5.5. Resultados detección de <i>Salmonella</i> spp por el método ELFA usando el sistema VIDAS..... | 36 |
| 5.6. PRUEBAS CONFIRMATORIAS..... | 38 |
| 5.6.1. Prueba serológica..... | 38 |
| 5.6.2. Pruebas bioquímicas | 39 |
| 5.7. Determinación de la Sensibilidad y especificidad de los métodos..... | 41 |
| 5.7.1. Sensibilidad y sensibilidad relativa | 43 |

| | | |
|--------|---|----|
| 5.7.2. | Especificidad y especificidad relativa..... | 43 |
| 5.7.3. | Eficiencia | 44 |
| 5.7.4. | Valor predictivo positivo (Vpp %) | 45 |
| 5.7.5. | Valor predictivo negativo (Vpn %)..... | 45 |
| 5.7.6. | Análisis estadístico de los datos (ANOVA) | 45 |
| 6. | CONCLUSIONES | 48 |
| 7. | RECOMENDACIONES..... | 50 |
| 8. | BIBLIOGRAFÍA..... | 51 |
| 9. | ANEXOS..... | 55 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Esquema de trabajo, muestras y controles para las pruebas | 25 |
| Tabla 2. Recuento de colonias <i>Salmonella enteritidis</i> en agar Plate Count..... | 32 |
| Tabla 3. Recuento de colonias <i>E. coli</i> en agar Plate Count | 32 |
| Tabla 4. Controles usados en la prueba | 34 |
| Tabla 5. Resultados siembra en medios de cultivo selectivos | 35 |
| Tabla 6. Resultado controles analizados en el sistema VIDAS. Método ELFA..... | 37 |
| Tabla 7. Resultados muestra analizada en el sistema VIDAS (mini VIDAS). Método ELFA..... | 37 |
| Tabla 8. Umbrales e interpretación | 37 |
| Tabla 9. Colonias sospechosas, típicas de <i>Salmonella</i> spp analizadas y resultado de la identificación bioquímica. | 40 |
| Tabla 10. Colonias que crecieron en los cultivos de la muestra sin esterilizar inoculada con <i>E. coli</i> | 40 |
| Tabla 11. Tablas de contingencia 2x2 para 1 nivel | 41 |
| Tabla 12. Determinaciones a partir de la tabla de contingencia | 42 |
| Tabla 13. Resultados del análisis de las muestras por el método tradicional y por el método ELFA. | 42 |
| Tabla 14. Estimación de la sensibilidad y especificidad relativa por el método ELFA usando el sistema VIDAS. | 43 |
| Tabla 15. Resultados obtenidos del análisis por los dos métodos, de las muestras inoculadas con <i>Salmonella enteritidis</i> | 46 |
| Tabla 16. Desviación estándar entre los métodos | 46 |
| Tabla 17. ANOVA | 46 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Equipo VIDAS, cono y cartucho, reacción | 21 |
| Figura 2 Esquema del proceso de análisis | 22 |
| Figura 3 Cepas cuantitativas en lenticulas | 23 |
| Figura 4 Esquema de trabajo..... | 25 |
| Figura 5 Kit <i>Salmonella</i> (SLM) y equipo Mini VIDAS | 29 |
| Figura 6. Controles prueba de aglutinacion en placa para detección de antígeno “O” | 38 |
| Figura 7. Prueba de aglutinación en placa para detección de antígeno “O” de colonias sospechosas..... | 39 |
| Figura 8. Sistema Crystal usado para la identificación bioquímica de las colonias | 39 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Prueba de viabilidad de las cepas de trabajo | 55 |
| Anexo 2. Bloque calefactor "heat and Go" con cartuchos VIDAS | 55 |
| Anexo 3. Resultado impreso Estándar y Controles <i>Salmonella</i> spp | 56 |
| Anexo 4. Colonias de <i>Salmonella</i> spp y de <i>E. coli</i> en medios de cultivo selectivos | 56 |
| Anexo 5. Resultados análisis en el equipo mini VIDAS - Método ELFA | 57 |

1. INTRODUCCION

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.

La salmonelosis, causada por la bacteria *Salmonella* es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más común y ampliamente extendida (OMS. 2013) por todo el mundo, y afecta tanto al hombre como a los animales (OIE. 2008).

Determinados factores ambientales y de manejo se han asociado a elevados niveles de *Salmonella* en la población animal (Márquez, 2008). En la mayoría de los casos la infección penetra por ingestión de agua o alimentos contaminados con *Salmonella* (Figueroa, 1984), ejemplo de ello es que los animales se pueden infectar cuando se los alimenta con piensos contaminados (Andreoletti, 2008)

Para controlar la diseminación de ese tipo de enfermedades, se han implementado normas alimentarias que establecen niveles permisibles o ausencia de determinados microorganismos en los alimentos, esto ha obligado a las industrias y a los comercializadores de alimentos a realizar análisis microbiológicos a sus productos. Desafortunadamente para ellos, el análisis para la detección de *Salmonella* spp es bastante largo y dispendioso.

Los métodos microbiológicos tradicionales considerados de referencia, utilizados actualmente para la detección de *Salmonella* spp requieren de diversas etapas de análisis hasta llegar a la confirmación del microorganismo 4 a 5 días después de iniciado el proceso. Es tiempo causa retrasos en la utilidad de las materias primas empleadas para elaborar los piensos, generando pérdidas económicas en las empresas, es allí donde radica la importancia y necesidad de emplear métodos alternativos de análisis.

La implementación nuevos métodos y tecnologías para la detección y aislamiento de *Salmonella* spp en alimentos supone ventajas considerables frente a los métodos convencionales o de referencia, como son la rapidez, automatización e interpretación de resultados (Fornés, 2008). Sin embargo, antes de usar un método

alternativo este debe validarse para garantizar que la prueba es útil para el fin que se quiere implementar y que se obtienen resultados confiables y comparables con los obtenidos por el método de referencia.

El presente trabajo se realizó con el fin de validar el método alternativo ELFA (análisis enzimático ligado a fluorescencia) para la detección de *Salmonella* spp en materias primas para la producción de pienso para animales.

Para su desarrollo se analizó una muestra de harina de soya contaminada de forma artificial con *Salmonella enteritidis*, y se realizó su análisis de forma simultánea tanto por el método tradicional (método de referencia señalado en la norma NC ISO 6579:2008) como por el método ELFA usando el sistema VIDAS (Método Easy *Salmonella* certificado NF VALIDATION (BIO 12/16-09/05)). Además se realizó la confirmación de los microorganismos detectados mediante la aplicación de pruebas bioquímicas y serológicas.

Con los resultados obtenidos en los análisis se determinaron varios parámetros como sensibilidad y especificidad relativa con resultados de 90% y 100% respectivamente, también se evaluó su eficiencia que fue de 95,45%. Estas medidas permiten establecer que método ELFA es eficaz y que se obtienen resultados confiables.

Además se realizó un análisis estadístico (ANOVA) para determinar la diferencia que existe o no entre los resultados obtenidos por los métodos. Se pudo establecer que no existen diferencias significativas entre los métodos.

Después de evaluar el método ELFA y analizando los resultados obtenidos en los parámetros evaluados, es posible decir que si se valida el método y que puede ser implementado para la detección de *Salmonella* spp en materias primas para la elaboración de pienso para animales.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Validar de la técnica de Ensayo enzimático ligado a fluorescencia (ELFA) frente a la metodología tradicional para el aislamiento de *Salmonella* spp en materia prima para la elaboración de pienso para animales.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aplicar la metodología tradicional para el aislamiento de *Salmonella* spp en materias primas para la elaboración de pienso para animales.
2. Aplicar la técnica ELFA usando el sistema VIDAS para la detección de *Salmonella* en materias para la producción de pienso para animales.
3. Comparar los resultados obtenidos mediante la aplicación de las dos metodologías y determinar la eficiencia del método de análisis alternativo siguiendo los parámetros establecidos en la Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025.

3. MARCO TEORICO

3.1. VALIDACIÓN

De acuerdo a la Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025, validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto (NTC-ISO/IEC 17025, 2015).

Es un proceso basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante la cual se pone de manifiesto que un procedimiento analítico determinado posee unas características de funcionamiento adecuadas a la aplicación que se le quiere dar (Camaró-Sala, et al 2014).

La validación de un método de ensayo constituye una de las actividades necesarias para garantizar la validez de los resultados de un laboratorio y es internacionalmente reconocida como criterio imprescindible para el establecimiento de un completo sistema de calidad (A.E.A.S. 2012b).

En general, la validación de procedimientos se realiza cuando se pone en marcha una técnica analítica. Su objetivo es garantizar que los métodos cumplen determinados criterios (Camaró-Sala, et al 2014).

La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de la aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto (NTC-ISO/IEC 17025, 2015).

En el proceso de validación del método está implícito que los estudios para determinar los parámetros de desempeño se realizan usando equipos dentro de especificaciones, que están trabajando correctamente y que están calibrados adecuadamente. Asimismo, el operador que realiza los estudios debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y debe poseer suficiente conocimiento sobre el trabajo a realizar con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio (Guía Eurachem. 2005).

3.2. METODOS A VALIDAR

La norma NTC ISO 17025 señala que “el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto”.

3.2.1. Métodos 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 (Camaró-Sala, et al 2014).

3.2.2. Métodos 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 (ILAC G18:04, 2010).

3.3. TIPOS DE VALIDACION

En función del método que se emplee el laboratorio deberá elegir un tipo de validación. Por ello es necesario las modalidades de validación y los diferentes tipos de métodos existentes, según sean normalizados o no (Camaró-Sala, et al 2014).

3.3.1. Validación Primaria

Es un proceso exploratorio que tiene como meta establecer los límites operacionales y las características de desempeño de un método nuevo. Debe dar origen a especificaciones numéricas y descriptivas para el desempeño e incluir una descripción detallada y precisa del objeto de interés. Corresponde con la validación inicial que deben llevar a cabo los laboratorios y casas comerciales que diseñan un equipo diagnóstico, una prueba nueva o la unión en un solo protocolo de varios

métodos normalizados o no. También corresponde con la caracterización que debe realizarse a una técnica que se desarrolla en un laboratorio para su propio uso (Camaró-Sala, et al 2014).

Realizada con un protocolo extenso en el que se contempla una primera fase de validación por parte de un laboratorio experto y una segunda fase que incluye la realización de un ejercicio colaborativo con la participación de varios laboratorios, y que utiliza un diseño de experiencias y unos criterios de evaluación de resultados preestablecidos y reconocidos internacionalmente (Fornés, 2008).

3.3.2. Validación Secundaria

Llamada también verificación, tiene lugar cuando un laboratorio pone en marcha un método desarrollado por otros. La validación secundaria tiene como objetivo principal recopilar los datos que permitan demostrar que el laboratorio es capaz de cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria (PARRA & SALAZARv2007).

Se trata de la validación que hay que llevar a cabo cuando se introduce un equipo diagnóstico, método o prueba en un laboratorio clínico y que ya está validada primariamente por organizaciones internacionales (Camaró-Sala, et al 2014)

Consiste básicamente en comprobar que el laboratorio es capaz de cumplir con los requisitos de funcionamiento del método previamente establecidos en las condiciones habituales de trabajo (ILAC G18:04, 2010).

Normalmente la verificación supone determinar el cumplimiento de menos parámetros y hacer menos mediciones de cada parámetro que si se tratara de una validación. Los resultados de la verificación pueden diferir levemente de los obtenidos en la validación, pero debe determinarse si son aceptables teniendo en cuenta el objetivo que se persigue al utilizar el método (UNODC. 2010).

3.3.3. Validación prospectiva

Es el establecimiento documentado de la evidencia de que un sistema hace lo que debe hacer basándose en un protocolo planificado, se realiza en productos nuevos y se lleva a cabo antes de la comercialización del producto. En la validación prospectiva de análisis, un plan experimental llamado Protocolo de Validación es ejecutado el cual es determinado en base a la información de apoyo recopilada de los resultados de ensayos experimentales previos (Acosta & Ramírez. 2007).

3.3.4. Validación Retrospectiva

Estudio para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que establece previsto sobre la base de una revisión y análisis de información histórica, proporcionada por los registros de producción y de control de calidad (Acosta & Ramírez. 2007).

3.4. PARAMETROS DE VALIDACION

Los parámetros de validación son aquellas características del método para las que:

- Se definen requisitos
- Se realizan experimentos para conseguirlos
- Se valoran los resultados obtenidos frente a requisitos para poder declarar válido el método (Laso. 2005).

3.4.1. Precision

Grado de concordancia entre resultados de ensayo independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas. La precisión no se relaciona con el valor verdadero o el valor especificado. La precisión depende solo de la distribución de errores aleatorios y no tiene ninguna relación con el valor verdadero o el valor especificado. Se expresa como coeficiente de variación (Camaró-Sala, et al 2014).

3.4.2. Repetibilidad

Grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo elemento mensurado realizadas bajo las mismas condiciones de medición (GTC 84, 2003).

3.4.3. Reproducibilidad

Grado de concordancia entre los resultados de las mediciones en el mismo elemento mensurado realizadas bajo condiciones de medición alteradas (GTC 84, 2003).

3.4.4. Robustez

Insensibilidad de un método analítico frente a pequeños cambios en procedimiento (GTC 84, 2003).

3.4.5. Limite De Deteccion

La menor cantidad o concentración de un analito que puede detectarse de manera fiable o diferenciada por un método específico (A.E.A.S. 2012a).

Es la menor magnitud que puede examinarse de un analito (por ejemplo, microorganismo, etc.), que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. En el caso de los cultivos microbiológicos es el número mínimo de organismos que pueden ser detectados en una cantidad de muestra con una probabilidad dada, pero en cantidades que no pueden ser claramente cuantificadas (Camaró-Sala, et al 2014).

3.4.6. Limite De Cuantificacion

Las concentración más baja del analisis que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad, dentro de una matriz en particular y por un método específico (A.E.A.S. 2012a).

3.4.7. Especificidad o Selectividad

La capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en la presencia de otros compuestos en la matriz bajo condiciones de prueba establecidas (GTC 84, 2003).

3.4.8. Linealidad

Capacidad de un método analítico para generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito o valor del parámetro de la muestra, dentro de un rango (OGA-GEC-016, 2007).

3.4.9. Exactitud

Grado de concordancia entre el valor aceptado como un valor verdadero convencional, o un valor de referencia, y el valor encontrado (INS, 2014).

3.4.10. Sensibilidad

En general, es la fracción total del número de resultados positivos asignados correctamente con el método utilizado (Camaró-Sala, et al 2014).

3.5. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO

3.5.1. Método de Referencia

Método reconocido internacionalmente y ampliamente aceptado (INS, 2014).

3.5.2. Método alternativo

Método de análisis que demuestra o estima para una categoría dada de productos, el mismo analito de la misma forma que el método de referencia (INS, 2014).

La validación de un método alternativo es el procedimiento para demostrar si los resultados obtenidos por dicho método son comparables con aquellos obtenidos utilizando los métodos de referencia (Ortega et al, 2010).

El objetivo de la verificación es comprobar que podemos detectar un nivel suficientemente bajo de microorganismos en las diferentes matrices objeto de análisis.

La validación de los métodos alternativos comprende un análisis, dependiendo del tipo de método (cualitativo o cuantitativo), y del estudio, teniendo en cuenta la fase, si es intra o interlaboratorial (Fornés. 2014).

En el análisis microbiológico existen diferentes tipos de métodos:

- **Métodos cualitativos.** Su objetivo es detectar la presencia ó ausencia de un microorganismo objetivo en una cantidad determinada de muestra (Laso, 2005).
- **Métodos cuantitativos.** Su objetivo es detectar un valor numérico (nº UFC/unidades de alimento), de un microorganismo (Laso, 2005).

3.6. *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Los microorganismos que lo comprenden son bacilos Gram negativos con movimiento (excepto *S. gallinarum* y *S. pullorum*), aerobios y facultativamente anaerobios; fermentan la gluocsa produciendo gas excepto *S. typhy*, que nunca lo produce. No utilizan lactosa (Florez, 1981).

Las Salmonellas forman un grupo antigénico complejo con más de 2400 serovariedades diferenciadas por antígenos somáticos (O) de naturaleza lipopolisacárida, y por antígenos flagelares (H) de naturaleza proteica (VIDAS *Salmonella* 30702).

3.7. SALMONELOSIS

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa del hombre y los animales causada por microorganismos de dos especies de *Salmonella* (*Salmonella* entérica y *S. bongori*) (OIE. 2008).

La gastroenteritis por *Salmonella* es una zoonosis que se transmite por la ingestión de alimentos, agua o fómites contaminados por las heces de un animal o persona infectados y constituye una pandemia de distribución mundial (Gil-Seta et al, 2002).

Aunque fundamentalmente son bacterias intestinales, *Salmonella* está muy distribuida en el ambiente y se encuentran con frecuencia en vertidos de granjas, en las aguas residuales humanas y en cualquier material con contaminación fecal (OIE. 2008).

En todos los países existe la salmonelosis, pero parece tener una mayor prevalencia en áreas de producción animal intensiva, especialmente de cerdos, de terneros y de algunos tipos de aves criadas en cautividad. Muchos animales, en especial los cerdos y las aves, pueden estar infectados sin manifestar la enfermedad clínica. Tales animales pueden ser importantes en la difusión de la enfermedad entre explotaciones y como fuentes de contaminación alimentaria y de infección humana (OIE. 2008).

La alimentación animal juega un papel importante en la exposición y transmisión en granjas de contaminaciones microbianas, especialmente *Salmonella*, al tratarse de una vía principal de introducción de infecciones. Aunque se describen distintos rangos de contaminación entre países, la contaminación por *Salmonella* es relativamente alta y puede aislarse en una amplia variedad de alimentos destinados a animales, tanto de origen vegetal como animal (Valverde, 2012). Los animales se pueden infectar cuando se los alimenta con piensos contaminados por *Salmonella*. Se ha observado la transmisión de *Salmonella* de los piensos a los animales que los consumen y a los productos derivados de estos animales (Andreoletti, 2008).

3.8. PIENSO

Cualquier sustancia o producto, incluidos los aditivos, destinado a la alimentación por vía oral de los animales, tanto si ha sido transformado entera o parcialmente como si no (Europeo, P. 2002).

El pienso es un factor clave en la producción ganadera, tanto desde el punto de vista económico como desde el punto de vista sanitario, pudiendo ser el responsable

de la transmisión de sustancias indeseables (ej. dioxinas) o enfermedades infecciosas transmisibles al ser humano. También se le ha considerado responsable de participar en la transmisión de otros agentes zoonóticos, como *Salmonella* o *E. coli*.

Se ha observado la transmisión de *Salmonella* de los piensos a los animales que los consumen y a los productos derivados de estos animales (Valverde, 2012).

El control de la contaminación del pienso, comienza con el control de las materias primas, siguiendo a lo largo de todo el proceso de fabricación.

3.9. MATERIAS PRIMAS

Según su naturaleza, algunas materias primas son más susceptibles de contaminación que otras. A los productos proteicos de origen animal como la harina de pescado, se les ha asociado una tasa mayor de contaminación por *Salmonella*. Respecto a los ingredientes vegetales, la contaminación se centra principalmente según estudios en productos proteicos como las harinas de oleaginosas (soja, girasol y algodón) (Valverde, 2012).

3.10. HARINA DE SOYA

La harina de soya es una excelente fuente de energía, en particular lisina, conteniendo además cantidades importantes de otros nutrientes esenciales, tales como ácido linoleico y colina, cuya disponibilidad es además alta. A menudo, la harina procesada se descascarilla parcialmente para elevar su valor nutritivo en piensos de lechones y pollitos de primera edad (de Blas Beorlegui, et al 2003). Su naturaleza vegetal y riqueza protésica son factores que la hacen susceptible a la contaminación microbiana.

La popularidad que la soja ostenta dentro del sector pecuario se debe a su vasta disponibilidad y capacidad de suministrar nutrientes requeridos por el animal (Ej., aminoácidos, ácidos grasos) en forma relativamente económica. Desde un punto de vista nutricional, la principal ventaja que la harina de soja posee para la producción animal es su alto contenido de proteína rica en algunos aminoácidos digestibles, particularmente lisina y triptófano (Ipharraguerre, 2006).

Esta harina representa aproximadamente 70% del consumo mundial de harinas proteicas. Durante el año 2004, se produjeron en USA 35.7 millones de toneladas de harina de soja de las cuales el 50% fueron consumidas por aves, 26% por cerdos, 18% por bovinos, y 2.5% por peces (de Blas Beorlegui, et al 2003).

3.11. SISTEMA VIDAS PARA LA DETECCION DE *Salmonella* spp

VIDAS® *Salmonella* es un test inmunoenzimático, que permite la detección de antígenos de *Salmonella* por el método ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) (VIDAS *Salmonella* 30702).

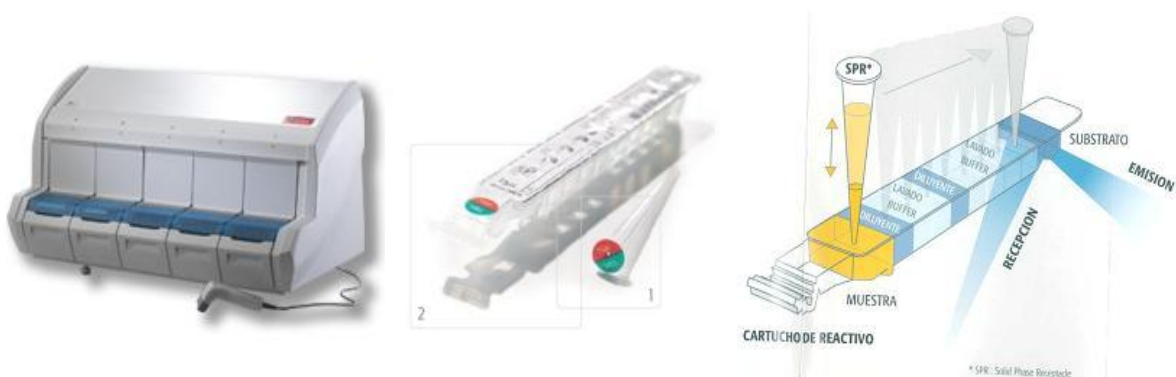
El test VIDAS es un reactivo unitario listo para su uso.

- El cono (SPR®), en el que están pegados antígenos y/o anticuerpos, actúa como fase sólida de la reacción. Actúa como sistema de pipeteo
- El Cartucho contiene todos los reactivos necesarios para la reacción.

En cada etapa de la reacción se aspiran y expelen los reactivos. Este original concepto previene de toda contaminación entre reactivos y entre muestras. Además la ausencia de tubos, jeringas y agujas reduce el mantenimiento del sistema al mínimo (BioMérieux. 2015).

El sistema VIDAS utiliza la técnica ELFA. Combinando el método ELISA con una lectura final en fluorescente azul. Esta lectura asegura excelentes resultados en materia de sensibilidad y especificidad (BioMérieux. 2015).

Figura 1 Equipo VIDAS, cono y cartucho, reacción



Tomada de: www.biomerieux.com

4. MATERIALES Y METODOS

La validación de la técnica ELFA usando el sistema VIDAS (mini Vidas) como método alternativo para la detección de *Salmonella* spp en materia prima para la elaboración de pienso (alimento concentrado) para animales se realizó en paralelo con la detección de *Salmonella* spp por el método tradicional.

Las pruebas se realizaron a partir de una sola muestra contaminada de forma artificial, una parte con una cepa de *Salmonella* spp como muestra problema y otra parte contaminada con *E. coli* como control negativo. Con esta muestra se trabajó por las dos metodologías.

La primera parte del proceso de análisis correspondiente al pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo, fue la fase común de las dos metodologías, después de allí cada método se realizó de forma individual hasta llegar a las pruebas confirmatorias como se muestra en la figura 2.

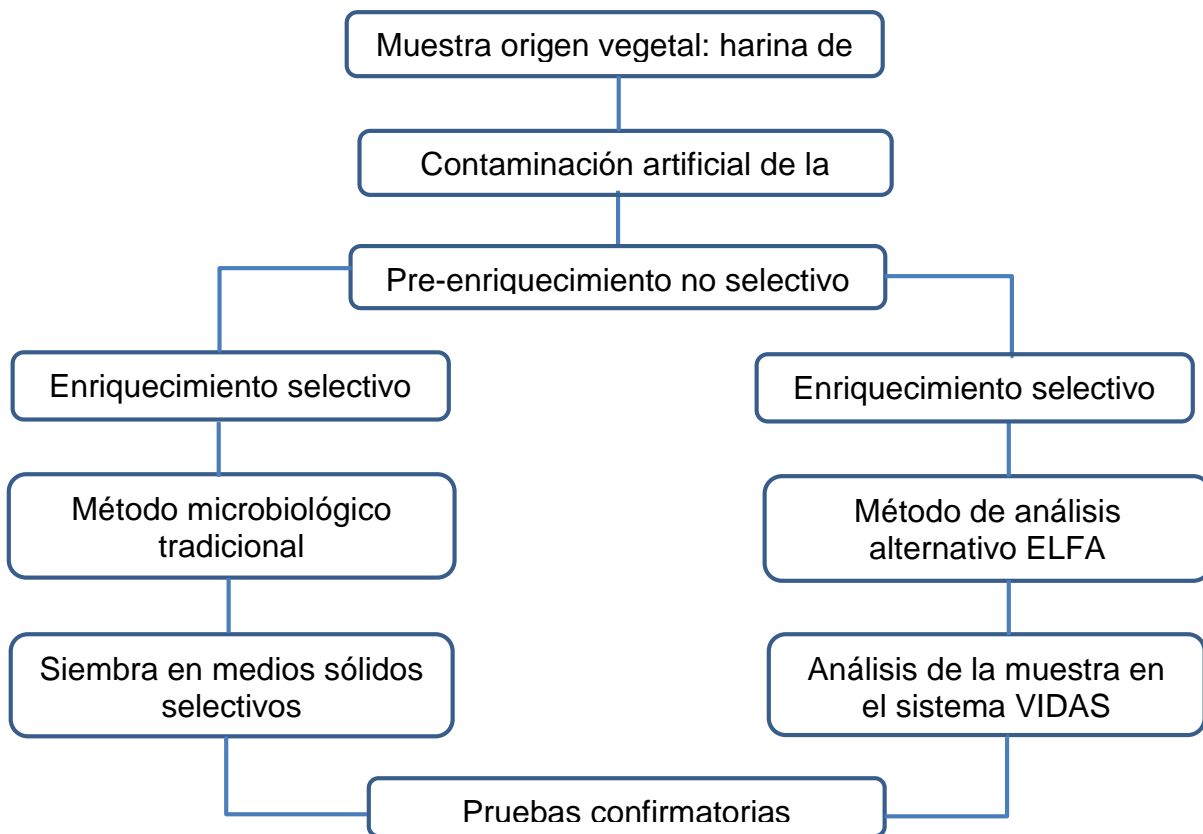


Figura 2 Esquema del proceso de análisis

4.1. PREPARACION DEL INOCULO MICROBIANO

Los materiales utilizados para la preparación del inóculo fueron:

- Harina de soya sin esterilizar
- Harina de soya estéril
- Cepas microbianas:
 - Cepas cuantitativas en lenticulas MICROKIT concentración media (10^3 - 10^5 UFC / lenticula). (Figura 3).
 - *Salmonella enteritidis* WDCM 00030
 - *E. coli ssp tropicalis* de acequia Bucaramanga 96% CCCNT 0002
- Suero fisiológico
- Tubos de vidrio
- Cajas de Petri
- Agar Plate count
- Frascos schott estériles, con 225 mL de agua peptonada tamponada estéril.

Las cepas (figura 3) (*Salmonella enteritidis* WDCM 00030 y de *E. coli ssp tropicalis* de acequia Bucaramanga 96% CCCNT 0002) se utilizaron de acuerdo a las indicaciones de modo de empleo de Laboratorios MICROKIT así: se depositó cada una de las lenticulas dentro de un tubo con 10 mL de suero fisiológico verificando que quedaran en el fondo, se agitaron en vortex varias veces y se dejaron reposar por 10 minutos hasta que se disolvieron completamente (Microkit).



Figura 3 Cepas cuantitativas en lenticulas

- Después se preparó una serie de diluciones 10^{-1} y 10^{-2} a partir de la cepa disuelta 10^0 .

- Para verificar la concentración de UFC/ mL de las diluciones se sembró 1mL de cada una de estas, por duplicado, en agar plate count, se incubó a 37 °C por 24 horas y posteriormente se realizó el recuento de colonias en cada una de las cajas de Petri y se calculó el promedio de UFC/mL en cada una de las diluciones 10^0 , 10^{-1} y 10^{-2} . Los resultados se registraron en una tabla 1 y 2
- Durante el recuento fue importante tener en cuenta que al diluir las cepas en un volumen de 10 mL de solución, el recuento por mL será la décima parte (10^{-1}) del recuento certificado de la lenticula¹, por lo tanto, en la dilución 10^0 se esperó tener un recuento de entre $10^2 - 10^4$ UFC/mL (100 – 10000 UFC/mL) ya que la cepa inicial según la casa comercial tenía una concentración de $10^3 - 10^5$ UFC/lenticula.
- Una vez confirmada la concentración de microorganismos/mL en cada una de las diluciones se realizó una dilución adicional a partir del tubo de 10^{-2} para obtener uno de concentración 10^{-3} .

4.2. PRUEBA DE VIABILIDAD DE LAS CEPAS

Después de reconstituir las cepas microbianas, *Salmonella enteritidis* y *E. coli* ssp, se sembraron en medios de cultivo sólidos, Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), Hektoen entérico (HE) y en CHROMagar *Salmonella*, para evaluar el crecimiento de los microorganismos, se incubaron 24h \pm 3h a 37 °C \pm 1°C. Transcurrido ese tiempo se revisaron los cultivos (Anexo 1), se evaluó las características de las colonias y se realizó coloración de Gram.

4.3. PRUEBA DE ESTERILIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Una parte representativa del total de las cajas de medios de cultivo selectivos, XLD, HE y Chromagar, que se prepararon, se llevaron a incubación por 7 días a 37 °C \pm 1°C, para verificar que estuviesen libres de contaminantes, además de verificar que no perdieran sus características, color, apariencia y que no se deshidrataron durante ese tiempo. Esto se realizó como control de calidad de los medios, antes de usarlos en las pruebas.

4.4. CONTAMINACION DE LA MUESTRA

Después de tener el inóculo estandarizado se realizó un esquema de trabajo (Tabla 1) para la preparación de las muestras y de los controles con el que se ejecutó los ensayos (Figura 4).

Tabla 1. Esquema de trabajo, muestras y controles para las pruebas

| Control (+) cepa <i>Salmonella</i> spp | | | Muestra (+) <i>Salmonella</i> spp | | | Control (-) muestra <i>E. coli</i> | | | Control (-) muestra | | |
|---|-----------|-----------|--------------------------------------|-----------|-----------|---------------------------------------|-----------|-----------|------------------------|---|---|
| 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 1 | 2 | 3 |
| | | | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | | | |
| | | | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | | | |



Figura 4 Esquema de trabajo

- La matriz sólida que se utilizó para realizar la validación fue de origen vegetal harina de soya, y se determinó por medio de análisis microbiológico que no tuviera presencia de *Salmonella* spp.
- La contaminación artificial de la matriz sólida se realizó con las diluciones, 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} tanto de la cepa de *Salmonella enteritidis* como de *E. coli* ssp *tropicalis*.
- Se rotularon frascos schott que contenían 225 mL de agua peptonada tamponada estéril, por triplicado para cada dilución de trabajo. Luego se

adicionó 25g de la matriz sólida de harina de soya, se mezclaron por agitación y se dejaron reposar 30 minutos hasta que se logró la homogenización completa.

- Después se inoculó cada una de las muestras con 1mL de las diluciones de trabajo correspondientes (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) por triplicado. El mismo procedimiento se realizó para las dos cepas. Las muestras inoculadas con *Salmonella enteritidis* se consideraron muestras problemas en los ensayos y las muestras inoculadas con *E. coli* ssp *tropicalis* fueron tomadas como control negativo.

4.5. CONTROL NEGATIVO DE MUESTRA

- Se realizó un control negativo de la matriz sólida, la cual fue sometida a proceso de esterilización para garantizar que estuviera libre de cualquier microorganismo, posteriormente se realizó el mismo procedimiento de las muestras positivas.

Después de tener listas las muestras contaminadas de forma artificial y las muestras de control negativo, se inició el desarrollo de los protocolos para la detección de *Salmonella* spp tanto por el método microbiológico tradicional como por el método alternativo ELFA (Ensayo de Elisa ligado a Fluorescencia), empleando el sistema Mini VIDAS de la casa comercial Biomérieux.

4.6. DETECCION DE *Salmonella* spp EN ALIMENTOS DE CONSUMO ANIMAL POR EL METODO TRADICIONAL

MATERIALES

- Caldo Rappaport Vassiliadis (RVS)
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)
- Agar Hektoen entérico (HE)
- CHROMagar *Salmonella*
- Antisuero para *Salmonella* "O" Difco (BD)
- Kit BBL Crystal Entérico/No fermentador

Para la detección de *Salmonella* spp en la muestra de harina de soya, empleada como materia prima para la elaboración de alimento de origen animal se tomó como guía el método de referencia señalado en la norma NC ISO 6579:2008 (Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp – Método de referencia).

PROCEDIMIENTO:

4.6.1. Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo

- Se adicionaron 25 g de muestra en 225 mL de agua peptonada tamponada estéril. Para esta etapa se emplearon las muestras preparadas previamente.
- Para el control positivo se utilizaron las diluciones preparadas de *Salmonella enteritidis* 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , para cada una se preparó 1 tubo, se inoculó 1 mL de cada dilución en un tubo con 9 mL de agua peptonada tamponada estéril.
- Las muestras y los controles se incubaron durante 18 ± 2 h a 37 ± 1 °C

4.6.2. Enriquecimiento selectivo

- Transcurrido el tiempo de incubación se transfirió 0,1 mL de cada cultivo (muestras y controles) a tubos con 10 mL de caldo RVS
- Tanto la muestra problema (contaminada con *Salmonella enteritidis*) como la muestra control (inoculada con *E. coli ssp tropicalis*) se trabajaron por triplicado para cada dilución.
- Además se prepararon 3 tubos (uno por cada dilución) para el control positivo (cepa *Salmonella*) y 3 tubos para el control negativo, adicionando 0,1 mL de cada cultivo y pasándolo a caldo RVS.
- Los cultivos se incubaron 24 h \pm 3 h a $41,5$ °C \pm 1 °C

4.6.3. Siembra en placa

- La siembra en medio sólido se realizó en agar XLD, agar HE y agar cromogénico para *Salmonella* spp.

- De cada tubo con caldo de cultivo RVS, tanto de las muestras como de los controles, se realizó una siembra por agotamiento en los 3 medios de cultivo solidos elegidos.
- Las cajas de cultivo se incubaron por 24h ± 3h a 37 °C ± 1°C, transcurrido este tiempo se realizó la observación y lectura de las cajas.
- Todas las colonias con características típicas o presuntivas de *Salmonella* spp debieron ser confirmadas.

4.7. DETECCION DE *Salmonella* spp EN ALIMENTOS DE CONSUMO ANIMAL POR EL METODO ALTERNATIVO ELFA USANDO EL EQUIPO MINI VIDAS

MATERIALES

- Caldo SX” (bioMérieux ref. 42121)
- Equipo mini VIDAS
- Bloque calefactor (VIDAS Heat and Go)
- Kit Vidas® *Salmonella* (SLM) (Ref. 30702)
 - o Cartuchos
 - o Conos
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)
- Agar Hektoen entérico (HE)
- CHROMagar *Salmonella*
- Antisuero para *Salmonella* “O” Difco (BD)
- Kit BBL Crystal Entérico/No fermentador

En esta parte se evaluó el desempeño del equipo Mini VIDAS. Para realizar las pruebas se siguió el protocolo de análisis de la casa comercial bioMérieux: Método Easy *Salmonella* certificado NF VALIDATION (BIO 12/16-09/05) para todos los productos de alimentación humana y animal y muestras ambientales (excluyendo los entornos de ganadería) (VIDAS *Salmonella* 30702).

Antes del procesamiento de las muestras se realizó un montaje en el equipo del estándar y los controles positivo y negativo (Anexo 3), los cuales deben procesarse cada 14 días antes de realizar los análisis, ya que si estos no están registrados, el equipo da una señal de error y no permite realizar la prueba.



Figura 5 Kit *Salmonella* (SLM) y equipo Mini VIDAS

PROCEDIMIENTO:

4.7.1. Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo

- Para esta etapa se emplearon las muestras preparadas y contaminadas con las cepas de trabajo y las que se prepararon como control negativo de muestra (ver numerales 4.4 y 4.5).
- Para el control positivo se utilizaron las diluciones preparadas de *Salmonella enteritidis* 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , para cada una se preparó 1 tubo inoculando 1 mL de cada dilución en un tubo con 9 mL de agua peptonada tamponada.
- Las muestras y los controles se incubaron por 16 - 22h a 37 ± 1 °C

4.7.2. Enriquecimiento selectivo

- Después de la incubación se transfirió 0,1 mL de cada cultivo a tubos que contenían 10 mL de caldo SX2.
- Tanto la muestra contaminada con *Salmonella enteritidis* como la muestra inoculada con *E. coli ssp tropicalis* se trabajaron por triplicado para cada dilución.
- Para el control negativo de muestra se prepararon 3 tubos y del control positivo cepa se preparó 1 tubo por dilución, transfiriendo 0,1 mL del cultivo (incubado previamente) a tubos con caldo SX2.
- Los tubos se incubaron durante 22 - 26h \pm 3h a $41,5 \pm 1$ °C.

4.7.3. Montaje de la prueba VIDAS

- Se atemperaron los materiales del kit para *Salmonella* spp antes del montaje y se encendió el equipo para que estuviera listo para la prueba.
- Transcurrido el tiempo de incubación se transfirió 0,5 mL del caldo SX2 al pocillo correspondiente para la muestra en los cartuchos VIDAS, los cuales se ubicaron en el bloque calefactor (Heat and Go) (Anexo 2) para que se calentaran por 15 ± 1 minutos.
- Se retiraron los cartuchos del bloque calefactor y se dejaron enfriar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Los cartuchos con la muestra y los conos de reacción se ubicaron en la posición correspondiente para cada uno en el equipo.
- Se programó la prueba en el equipo y se dio inicio al proceso.
- Después de 45 minutos se obtuvieron los resultados de las pruebas.
- Todas las muestras que dieron resultado POSITIVO para *Salmonella* spp debieron ser confirmadas.
- Los cultivos en caldo SX2, de las muestras y controles con resultado POSITIVO, se sembraron en medios sólidos XLD, HE y en el chromagar.
- Se incubaron por $24h \pm 3h$ a $37^\circ C \pm 1^\circ C$.
- Se leyeron las cajas y a las colonias con características presuntivas de Salmonela se le realizó confirmación bioquímica y serológica.

4.8. CONFIRMACIÓN

Para la confirmación microbiológica se realizaron pruebas bioquímicas usando el sistema Crystal y pruebas serológicas mediante una prueba de aglutinación en placa para detección de antígenos somáticos "O".

Se llevó a cabo de forma simultanea tanto para las muestras procesadas por el método tradicional como para las muestras que fueron positivas por el método alternativo ELFA usando el mini VIDAS, en las que se observaron colonias características de *Salmonella* spp.

- Para las pruebas de confirmación se eligieron las cajas con agar XLD donde se observaron colonias con las características morfológicas típicas de *Salmonella* spp crecida en ese medio, colonias rojas con centro negro, de tamaño pequeño, lisas y brillantes.

- A las colonias con características típicas de *Salmonella* spp se les realizó una prueba serológica de aglutinación en placa para la detección de antígenos somáticos "O". Se utilizó antisuero "O", la prueba se realizó siguiendo las indicaciones de uso del fabricante.
- Después de confirmar que colonias eran positivas por la prueba de aglutinación en placa, se hizo un aislamiento de las colonias características en agar nutritivo y se incubo por $24h \pm 3h$ a $37\text{ °C} \pm 1\text{°C}$, con el fin de tener un cultivo puro para realizar la identificación bioquímica.
- Para la confirmación bioquímica se utilizó el sistema Crystal entérico / no fermentador, el montaje de la prueba se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Después de la incubación por 18h a 37 °C del sistema Crystal, se realizó la lectura de los paneles de la prueba y de acuerdo a los resultados obtenidos y usando un programa informático se obtuvo la identificación del microorganismo analizado.
- De la misma forma se realizó la confirmación de las colonias que crecieron en el control negativo de muestra inoculada con la cepa de *E. coli* ssp, cuyas características morfológicas eran diferentes a las de *Salmonella*. Esto se hizo para demostrar que otros microorganismos presentes en el medio de cultivo no interfirieron en los resultados obtenidos ya que estas muestras fueron negativas para *Salmonella* spp.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Revisión del inóculo microbiano

Después de reconstituir las cepas cuantitativas en lentículas de concentración media $10^3 - 10^5$ (1000 – 100000 UFC/mL) en 10 mL de solución fisiológica el recuento se redujo a la décima parte del inicial, es decir, quedó con una concentración celular entre $10^2 - 10^4$ (100 – 10000 UFC/mL).

Los recuentos obtenidos de la siembra por profundidad en agar plate count de las diluciones de las cepas microbianas de trabajo fueron los siguientes:

Tabla 2. Recuento de colonias *Salmonella enteritidis* en agar Plate Count

| | Dilución | Recuento | | Promedio |
|-----------------------------|------------------------------|--------------------------|--------|----------|
| | <i>Salmonella spp</i> | 10^0 | Caja 1 | 1104 |
| Caja 2 | | | 982 | |
| 10^{-1} | | Caja 1 | 97 | 98 |
| | | Caja 2 | 99 | |
| 10^{-2} | | Caja 1 | 9 | 8 |
| | | Caja 2 | 7 | |

Tabla 3. Recuento de colonias *E. coli* en agar Plate Count

| | Dilución | Recuento | | Promedio |
|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|--------|----------|
| | <i>E. coli</i> | 10^0 | Caja 1 | 173 |
| Caja 2 | | | 189 | |
| 10^{-1} | | Caja 1 | 72 | 66 |
| | | Caja 2 | 60 | |
| 10^{-2} | | Caja 1 | 9 | 9 |
| | | Caja 2 | 9 | |

Los resultados obtenidos para las dos cepas concordaron con lo esperado, así:

- Dilución 10^0 : entre 100 – 1000 UFC/mL
- Dilución 10^{-1} : entre 10 – 100 UFC/mL
- Dilución 10^{-2} : entre 1 – 10 UFC/mL
- Dilución 10^{-3} : entre 0 – 1 UFC/mL.

El límite de detección reportado en el instructivo del kit para *Salmonella* spp por el sistema VIDAS (ref 30702) es de **0,3 – 1,4 células / 25g**, por esta razón se decidió trabajar con la dilución 10^{-3} de las dos cepas, ya que en esta se encuentra el valor de UFC/mL más cercano al límite de detección del equipo.

5.2. Prueba de viabilidad de las cepas

Pasado el tiempo de incubación de las cepas, se evaluaron las colonias de las cepas de *Salmonella enteritidis* y de *E. coli*, las cuales presentaron características particulares en cada uno de los medios de cultivo (Anexo 1):

***Salmonella* spp**

- **Agar XLD**: Colonias de color rojo a amarillo con centro de color negro (BD, 2013c). Pequeñas, lisas y brillantes
- **Agar HE**: Colonias de color azul verdoso o azul; la mayoría de las cepas tienen centro negro o son totalmente de este color (BD, 2013b). Pequeñas, lisas y brillantes
- **Chromagar**: Colonias de color malva (= rosado a morado) (BD, 2013a). Pequeñas, lisas y brillantes

***E. coli*:**

- **Agar XLD**: Grandes, planos, de color amarillo
- **Agar HE**: Colonias grandes, color amarillo o salmón
- **Chromagar**: colonias medianas de color verde azulado

5.3. Prueba de esterilidad de los medios de cultivo

Los medios de cultivo preparados no presentaron crecimiento de microorganismos contaminantes durante el tiempo de la prueba. Tampoco perdieron sus características, color, aspecto y no se deshidrataron.

5.4. Resultados detección de *Salmonella* spp por el método tradicional

A continuación están registrados los resultados obtenidos del análisis de los controles y de las muestras por el método tradicional. Para el registro de los resultados se tuvo en cuenta las características morfológicas de las colonias en cada uno de los medios sólidos selectivos (Anexo 4).

Las colonias que presentaron características típicas en los medios sólidos, tal como las mencionadas en la prueba de viabilidad, se registraron como **colonias sospechosas**.

Las colonias con características diferentes a las de las colonias sospechosas, que presentaran las características típicas de las colonias de *E. coli* mencionadas en la prueba de viabilidad, se registraron en la tabla de resultados como **ausencia de colonias sospechosas de *Salmonella* spp**.

Tabla 4. Controles usados en la prueba

| | | XLD | HE | CHROM agar |
|---|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Control (+) <i>Salmonella</i> spp | Dil 10 ⁻¹ | Colonias sospechosas | Colonias sospechosas | Colonias sospechosas |
| | Dil 10 ⁻² | No hay crecimiento | No hay crecimiento | No hay crecimiento |
| | Dil 10 ⁻³ | No hay crecimiento | No hay crecimiento | No hay crecimiento |
| Control (-) muestra estéril | Caja 1 | No hay crecimiento | No hay crecimiento | No hay crecimiento |
| | Caja 2 | No hay crecimiento | No hay crecimiento | No hay crecimiento |
| | Caja 3 | No hay crecimiento | No hay crecimiento | No hay crecimiento |

Tabla 5. Resultados siembra en medios de cultivo selectivos

| Dilución | Medio de cultivo | Muestra con <i>Salmonella</i> spp | Muestra Control (-) <i>E. coli</i> |
|------------------|------------------|--|--|
| 10 ⁻¹ | XLD | Colonias sospechosas | Ausencia colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp |
| | HE | | |
| | chromagar | Ausencia colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp | Ausencia colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp |
| 10 ⁻¹ | XLD | Colonias sospechosas | Ausencia colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp |
| | HE | | |
| | chromagar | | |
| 10 ⁻¹ | XLD | Colonias sospechosas | Ausencia colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp |
| | HE | | |
| | chromagar | | |
| 10 ⁻² | XLD | Colonias sospechosas | Ausencia colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp |
| | HE | | |
| | chromagar | | |
| 10 ⁻² | XLD | Colonias sospechosas | Ausencia colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp |
| | HE | | |
| | chromagar | | |
| 10 ⁻² | XLD | Colonias sospechosas | Ausencia colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp |
| | HE | | |
| | chromagar | | |
| 10 ⁻³ | XLD | Colonias sospechosas | Ausencia colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp |
| | HE | | |
| | chromagar | | |
| 10 ⁻³ | XLD | Colonias sospechosas | Ausencia colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp |
| | HE | | |
| | chromagar | | |
| 10 ⁻³ | XLD | No hay crecimiento | Ausencia colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp |
| | HE | | |
| | chromagar | | |

En la tabla se puede observar que resultados de los controles positivos (cepa pura de *Salmonella enteritidis*) que se analizaron en las tres concentraciones 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³, no fueron los esperados, ya que inicialmente solo se observó crecimiento

(turbidez del medio) en el caldo RVS de la dilución 10^{-1} pero no en los tubos correspondientes a las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} y eso se vio reflejado después del repique en los medios sólidos selectivos. Este resultado pudo deberse a varios factores:

- Uno de ellos, es que no se haya homogenizado muy bien el tubo que contenía la cepa antes de tomar el inóculo y por esto no quedaron células en cual el volumen que se transfirió al agua peptonada para la etapa de pre-enriquecimiento.
- Otro factor que puede incidir en el resultado es la baja concentración celular en las diluciones 10^{-2} (1 – 10 UFC/mL) y 10^{-3} (0 – 1), al haber tan pocas células en el medio es posible que en el momento de pipetear el volumen aspirado no llevara ni una sola célula o al contrario que las tomara todas.

Los resultados obtenidos de las muestras contaminadas con *Salmonella enteritidis* (muestra problema) y con *E. coli* (control negativo de muestra) son satisfactorios y están de acuerdo con el esquema de contaminación de la muestra. En la mayoría de los cultivos en medios selectivos de la muestra problema, se observaron colonias sospechosas de *Salmonella* spp acompañadas de otro tipo de microorganismos (colonias diferentes), probablemente contaminantes naturales de la muestra. Solamente en una diluciones 10^{-3} del caldo RVS sembrado en medio sólido no se observaron colonias presuntivas. Mientras que en la muestra control (*E. coli*) solo crecieron colonias con características diferentes a las de *Salmonella* spp.

5.5. Resultados detección de *Salmonella* spp por el método ELFA usando el sistema VIDAS.

Los resultados de los controles negativos analizados en el VIDAS, muestran el mismo comportamiento que los obtenidos por el método tradicional, solo la dilución 10^{-1} es positiva para *Salmonella* spp, las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} fueron negativas (Tabla 6). Las razones de estos resultados pueden ser las mencionadas en el análisis de los resultados por el método tradicional.

Tabla 6. Resultado controles analizados en el sistema VIDAS. Método ELFA

| CONTROLES | | | | | |
|--|------------------|------------------|-------------------------|----------|----------|
| Control (+) cepa <i>Salmonella</i> spp | | | Control muestra estéril | | |
| 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 1 | 2 | 3 |
| Positivo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |

De las 9 muestras contaminadas con *Salmonella enteritidis* y analizadas en el VIDAS, solamente una de la dilución 10⁻³ dio resultado negativo, similar a al resultado por el método tradicional. Todas las muestras contaminadas con *E. coli*, dieron resultado negativo (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados muestra analizada en el sistema VIDAS (mini VIDAS). Método ELFA

| MUESTRA | | | | | |
|-------------------------------|----------|-----------------|------------------------|----------|----------|
| Muestra <i>Salmonella</i> spp | | | Muestra <i>E. coli</i> | | |
| 10-1 | 10-2 | 10-3 | 10-1 | 10-2 | 10-3 |
| Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |

En el informe impreso del resultado de los análisis que emite el equipo se debe revisar el VT (Valor del test) (Anexo 5), este valor sirve para interpretar el resultado positivo o negativo de acuerdo con los datos de umbrales e interpretación establecidos para el método como se ve en la tabla 8 tomada del instructivo VIDAS® *Salmonella* (SLM) ref 30702.

Tabla 8. Umbrales e interpretación

| Valor del test | Interpretación |
|----------------|----------------|
| < 0,23 | Negativo |
| ≥ 0,23 | Positivo |

Un resultado con un valor de test inferior al valor umbral indica que la muestra no contiene antígenos de *Salmonella*, o que contiene antígenos de *Salmonella* a una concentración inferior al límite de detección (VIDAS *Salmonella* 30702).

Un resultado con un valor de test superior o igual al valor umbral indica una muestra contaminada con *Salmonella* (VIDAS *Salmonella* 30702).

5.6. PRUEBAS CONFIRMATORIAS

5.6.1. Prueba serológica

Este análisis se le realizó a las muestras que resultaron positivas por el método VIDAS y las colonias sospechosas a *Salmonella* spp por el método tradicional. Como control se analizaron unas colonias presentes en los cultivos del control (-) de muestra (muestra contaminada artificialmente con *E. coli*), las cuales no presentaban características presuntivas de ser *Salmonella* spp.

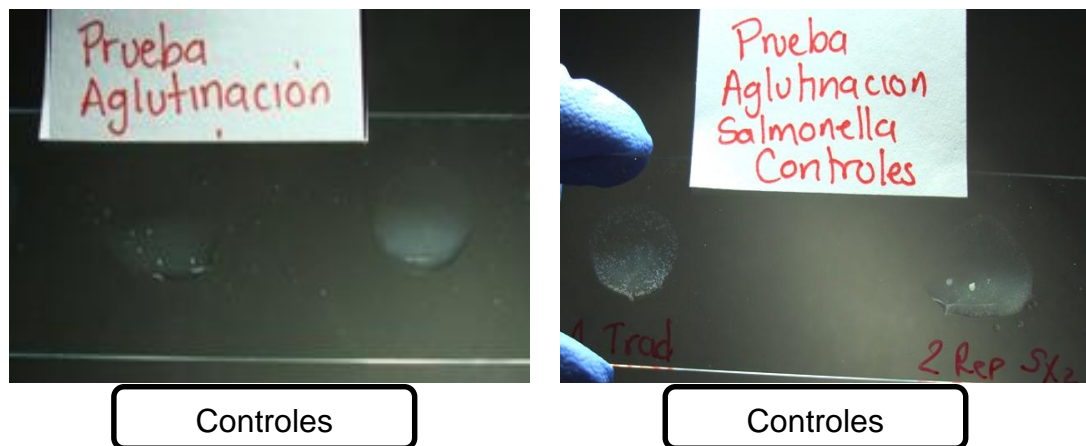


Figura 6. Controles prueba de aglutinación en placa para detección de antígeno "O"

En la Figura 6. Se puede observar la prueba aglutinación en placa para detección de antígenos somáticos "O". Imagen A, colonias puras tomadas de agar nutritivo, repicadas a partir de colonias sospechosas para *Salmonella* spp crecidas en agar HE (método tradicional). Imagen B, colonias puras tomadas de agar nutritivo repicadas en medio solido a partir del caldo SX2 (método alternativo VIDAS).

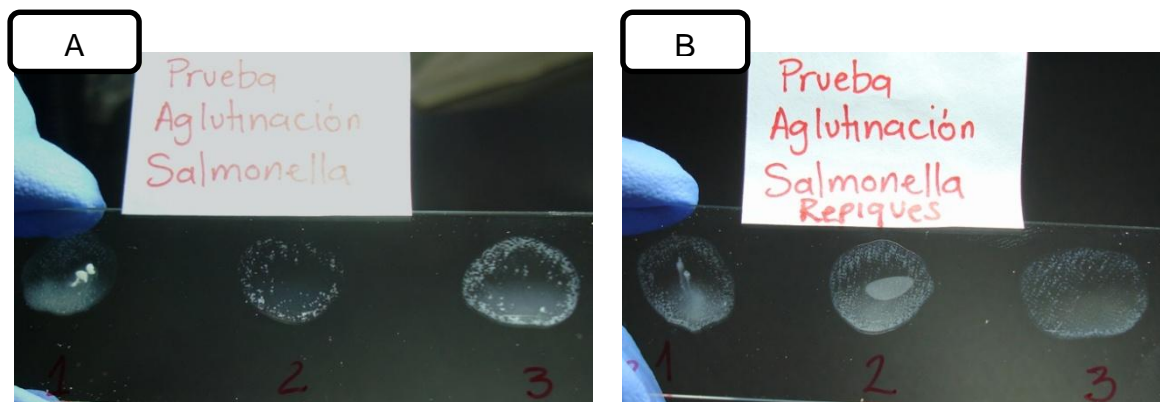


Figura 7. Prueba de aglutinación en placa para detección de antígeno "O" de colonias sospechosas

En la figura 7 se puede observar la prueba de aglutinación realizada a las colonias sospechosas, presuntivas de *Salmonella* spp.

5.6.2. Pruebas bioquímicas

La identificación bioquímica de las colonias sospechosas se realizó usando el sistema BD Crystal para entéricos no fermentadores (Figura 8). Las pruebas se realizaron a las colonias sospechosas aisladas por el método tradicional y las obtenidas a partir del caldo SX2 repicado en medios sólidos y de estos en agar nutritivo.

Se confirmó la identificación bioquímica de las colonias de los controles positivos usados en los dos métodos; de las colonias que crecieron en el cultivo de la muestra sin esterilizar inoculada con *E. coli* y de las colonias sospechosas obtenidas por ambos métodos a partir de la muestra contaminada intencionalmente con *Salmonella enteritidis* al inicio de las pruebas.

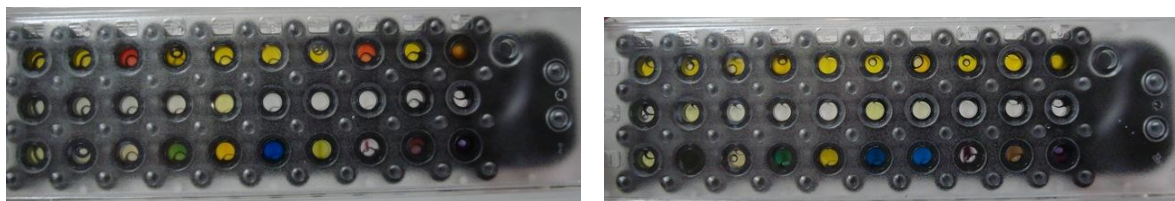


Figura 8. Sistema Crystal usado para la identificación bioquímica de las colonias

Tabla 9. Colonias sospechosas, típicas de *Salmonella* spp analizadas y resultado de la identificación bioquímica.

| Muestras analizadas para identificación bioquímica | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Control (+) cepa <i>Salmonella enteritidis</i> pura (método tradicional) | <i>Salmonella</i> spp 95,7% | No creció en el caldo RVS | No creció en el caldo RVS |
| Control (+) cepa <i>Salmonella enteritidis</i> , repique caldo SX2 (sistema VIDAS) | <i>Salmonella</i> spp 96,7% | No creció en el caldo SX2 | No creció en el caldo SX2 |
| Muestra contaminada con <i>Salmonella enteritidis</i> (método tradicional) | <i>Salmonella</i> spp 96,7% | <i>Salmonella</i> spp 96,7% | <i>Salmonella</i> spp 96,7% |
| Repique muestras positivas a <i>Salmonella enteritidis</i> (sistema VIDAS) | <i>Salmonella</i> spp 96,7% | <i>Salmonella</i> spp 96,7% | <i>Salmonella</i> spp 96,7% |

Tabla 10. Colonias que crecieron en los cultivos de la muestra sin esterilizar inoculada con *E. coli*.

| Muestras analizadas para identificación bioquímica | 10-1 | 10-2 | 10-3 |
|---|-----------------------|---|---|
| Muestra contaminada con <i>E. coli</i> (método tradicional) | <i>E. coli</i> 99,8 % | Otra enterobacteria diferente de <i>E. coli</i> | Otra enterobacteria diferente de <i>E. coli</i> |

Mediante esta prueba se pudo confirmar que las colonias que se habían señalado como sospechosas en los medios de cultivo selectivos si pertenecían al género *Salmonella* al igual que las muestras con resultado positivo por el método ELFA, también fueron confirmadas como *Salmonella* spp. Todas las cepas confirmadas presentaron niveles de confianza altos.

El análisis bioquímico de la muestra contaminada artificialmente con *E. coli*, mostró resultados variados e inesperados ya que además de identificar *E. coli* (nivel de confianza 99,8%) en las colonias aisladas, se identificaron otras enterobacterias.

Estos resultados obtenidos en la identificación bioquímica de las colonias que se creían eran de *E. coli* son la prueba de que la muestra estaba contaminada

naturalmente con otros microorganismos, a pesar de esto al analizarla en el VIDAS (método ELFA) el equipo arrojó resultados negativos para *Salmonella* spp, es importante señalar que esto se debe a la alta especificidad del método ya que ninguno de los microorganismos presentes en la muestra interfirió en el resultado.

5.7. Determinación de la Sensibilidad y especificidad de los métodos

La determinación de la sensibilidad y especificidad de los métodos se realizó empleando tablas de contingencia de 2x2 para un nivel. Estos parámetros sirven para evaluar la eficacia de los métodos y en este caso particular para el método ELFA el cual es el objetivo de este trabajo.

Tabla 11. Tablas de contingencia 2x2 para 1 nivel (Laso, 2005)

| | + | - | N |
|---|--|--|--------------|
| + | a (Muestras positivas con resultado positivo) (VP) | b (Muestras negativas con resultado positivo) (FP) | a + b |
| - | c (muestras positivas con resultado negativo) (FN) | d (Muestras negativas con resultado negativo) (VN) | c + d |
| | A + C | B + D | |

Donde:

- **a o VP** = Verdaderos Positivos
- **b o FP** = Falsos Positivos
- **c o FN** = Falsos Negativos
- **d o VN** = Verdaderos Negativos
- N = No. total de datos

Con los datos registrados en la tabla de contingencia se determinaran los siguientes parámetros:

Tabla 12. Determinaciones a partir de la tabla de contingencia

| Parámetro | Fórmula |
|--------------------------|--|
| Sensibilidad relativa % | $(a / (a + c)) * 100$ o $(VP / (VP + FN)) * 100$ |
| Especificidad relativa % | $(d / (d + b)) * 100$ o $(VN / (VN + FP)) * 100$ |
| Eficiencia % | $((a + d) / n) * 100$ |
| Vpp % | $(a / (a+b)) * 100$ |
| Vpn % | $(d / (c+d)) * 100$ |

A continuación, resultados obtenidos del análisis de las muestras por los dos métodos (Tabla). En la tabla no se registraron los resultados correspondientes a los controles positivos de cepa pura en las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} ya que estos no presentaron crecimiento en los caldos RVS ni en el medio SX2 y no había nada que detectar por ninguno de los dos métodos y alterarían de forma errónea los resultados de sensibilidad y especificidad de los métodos.

Tabla 13. Resultados del análisis de las muestras por el método tradicional y por el método ELFA.

| Muestra analizada | Dilución | Resultado | |
|--|----------|--------------------|-----------------------------|
| | | Método tradicional | Método ELFA (sistema VIDAS) |
| Control positivo | 10-1 | + | + |
| Muestra <i>Salmonella</i> spp | 10-1 | + | + |
| | 10-1 | + | + |
| | 10-1 | + | + |
| | 10-2 | + | + |
| | 10-2 | + | + |
| | 10-2 | + | + |
| | 10-3 | + | + |
| | 10-3 | + | + |
| | 10-3 | - | - |
| Control negativo <i>E. coli</i> | 1 | - | - |
| | 2 | - | - |
| | 3 | - | - |
| Muestra <i>E. coli</i> | 10-1 | - | - |
| | 10-1 | - | - |
| | 10-1 | - | - |
| | 10-2 | - | - |
| | 10-2 | - | - |
| | 10-2 | - | - |
| | 10-3 | - | - |
| | 10-3 | - | - |
| | 10-3 | - | - |

A partir de estos resultados se elaboró la tabla de contingencia para su análisis (tabla)

Tabla 14. Estimación de la sensibilidad y especificidad relativa por el método ELFA usando el sistema VIDAS.

| | Que se sabe son positivas (10) | Que se sabe son negativas (12) | N |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|----|
| Positivos | 9 | 0 | 9 |
| Negativos | 1 | 12 | 13 |
| Total | 10 | 12 | 22 |

Debido a que los resultados obtenidos en el análisis de las muestras fueron iguales por los dos métodos, solo se elaboró una tabla de contingencia y a partir de esta se realizaron los cálculos para la estimación de la sensibilidad y especificidad del método tradicional y la determinación de la sensibilidad y especificidad relativa del método alternativo ELFA.

5.7.1. Sensibilidad y sensibilidad relativa

$$\begin{aligned}
 \text{Sensibilidad relativa \%} &= (a / (a + c)) * 100 \text{ o } (VP / (VP + FN)) * 100 \\
 &= (9 / (9 + 1)) * 100 \\
 &= 90\%
 \end{aligned}$$

Aplicando las formulas de la tabla. Se obtuvo un valor de sensibilidad para el método tradicional del 90% al igual que para el método alternativo ELFA se obtuvo un 90 de sensibilidad relativa. Estas altas tasas de detección de microorganismo presentes en las muestras permite establecer que los resultados son confiables, ya que por los dos métodos se obtuvo 9 resultados positivos de las 10 muestras analizadas que estaban contaminadas con *Salmonella enteritidis*, aun cuando se analizaron muestras con bajas concentraciones de microorganismos/ 25g de muestra.

5.7.2. Especificidad y especificidad relativa

$$\begin{aligned}
 \text{Especificidad relativa \%} &= (d / (d + b)) * 100 \text{ o } (VN / (VN + FP)) * 100 \\
 &= (12 / (12 + 0)) * 100 \\
 &= 100\%
 \end{aligned}$$

Se obtuvo un resultado de 100% de especificidad para el método tradicional al igual que de especificidad relativa del 100% para el método alternativo ELFA.

Este valor obtenido por el método tradicional era de esperarse ya que se sabía desde el inicio de las pruebas que la muestra estaba libre de *Salmonella* y por lo tanto no debía crecer este microorganismo en los cultivos de las muestras usadas como control negativo que fueron inoculadas con *E. coli*

Es importante resaltar que al realizar la identificación bioquímica de las colonias que crecieron en los medios solidos de las muestras inoculadas con *E. coli*, además de detectar este microorganismo se evidencio la presencia de otras bacterias en la muestra que podían haber interferido en el análisis de las muestras por el método ELFA, aun así al analizarse en el VIDAS los resultados fueron negativos. Esto refleja la alta especificidad del método ya que pesar de haber otros microorganismos a parte de la cepa de *E. coli* inoculada intencionalmente en la muestra, el VIDAS.

Los valores obtenidos de sensibilidad (90%) y especificidad (100%) están muy cercanos a los reportados en el instructivo del kit de VIDAS® Salmonella (SLM) para algunas matrices analizadas:

- Productos cárnicos:
 - Sensibilidad: 100%
 - Especificidad: 99%
- Productos lácteos deshidratados:
 - Sensibilidad: 101,5%
 - Especificidad: 100%

Aunque no son las mismas matrices, el método reporta valores similares de estos parámetros evaluados, lo cual genera confianza al usar este método.

5.7.3. Eficiencia

Este parámetro se refiere a los aciertos respecto a los casos totales (Laso, 2005).

$$\begin{aligned}\text{Exactitud relativa} &= ((a + d) / n) \times 100 \\ &= ((9 + 12) / 22) * 100 \\ &= 95,45 \%\end{aligned}$$

Con este resultado es posible afirmar que los métodos son muy eficientes, el número de aciertos o resultados verdaderos es muy cercano al total de casos o muestras que son positivas.

5.7.4. Valor predictivo positivo (Vpp %)

$$\begin{aligned}\% Vpp &= (a / (a+b)) \times 100 \\ &= (9 / (9 + 0)) \times 100 \\ &= 100\%\end{aligned}$$

El método alternativo tiene un 100% de posibilidad de detectar como positiva cuando se le realiza el análisis a una muestra que es positiva verdadera y este resultado puede ser confirmado (Cáceres, 2007).

5.7.5. Valor predictivo negativo (Vpn %)

$$\begin{aligned}VPN &= (d / (c+d)) \times 100 \\ &= (12 / (1 + 12)) \times 100 \\ &= 92,30\%\end{aligned}$$

El valor predictivo negativo de una prueba se refiere a esa parte de casos verdaderamente negativos entre los casos negativos detectados por la prueba. Para el método ELFA es de 92,30 %.

5.7.6. Análisis estadístico de los datos (ANOVA)

Se realizó un análisis estadístico de varianza, ANOVA, (Tabla 17) a los resultados obtenidos del análisis por las dos metodologías de las muestras contaminadas de forma intencional con *Salmonella enteritidis* (Tabla 15), para determinar si existen diferencias significativas entre los métodos de análisis tradicional y alternativo (ELFA).

Tabla 15. Resultados obtenidos del análisis por los dos métodos, de las muestras inoculadas con *Salmonella enteritidis*.

| Resultados positivos de las muestras analizadas contaminadas artificialmente con <i>Salmonella enteritidis</i> | | | | |
|--|---------------------------------------|--|--|---------------------------|
| | Control (+) dilución 10 ⁻¹ | Dilución 10 ⁻¹ ₁ | Dilución 10 ⁻² ₂ | Dilución 10 ⁻³ |
| TRADICIONAL | 1 | 3 | 3 | 2 |
| VIDAS | 1 | 3 | 3 | 2 |

Tabla 16. Desviación estándar entre los métodos

| | |
|---------------------|------------|
| Promedio total | 2,25 |
| Desv estándar (Srw) | 0,88640526 |

Los resultados obtenidos durante a validación de la técnica ELFA para la detección de *Salmonella* spp fueron similares a los obtenidos por el método de referencia. La desviación estándar (tabla 16) de los datos obtenidos por el método de tradicional y por el método ELFA es bastante baja (0,88), esto indica que hay poca dispersión entre los resultados obtenidos por cada método.

Tabla 17. ANOVA

| Análisis de varianza de un factor | | | | |
|-----------------------------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| RESUMEN | | | | |
| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
| Metodo Tradicional | 4 | 9 | 2,25 | 0,9166667 |
| Metodo ELFA (VIDAS) | 4 | 9 | 2,25 | 0,9166667 |

| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| Entre grupos | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 5,98737761 |
| Dentro de los grupos | 5,5 | 6 | 0,916666667 | | | |
| Total | 5,5 | 7 | | | | |

Con el valor estadístico de F (Fisher) se puede determinar si hay o no diferencias significativas entre los datos y así mismo entre los métodos. El valor hallado de F

(0) es menor que el F crítico (5,98), lo cual indica que no existen diferencias significativas de los datos; además el valor de P (1) es $>$ que el valor de $\alpha=0,05$, lo cual indica que la variabilidad interna entre los datos es muy baja y que no existe diferencias significativas entre los métodos de análisis.

Después de realizar un análisis completo de los resultados obtenidos por el método ELFA de compáralos con los resultados obtenidos por el método tradicional para la detección de *Salmonella*, se determinan parámetros como la sensibilidad y la especificidad relativas con tasas de 90% y 100% respectivamente, se puede afirmar con seguridad que obtienen resultados confiables y que el método es muy eficiente (94,45%). Además el análisis estadístico (Tabla 17) muestra que no existen diferencias significativas entre los métodos.

Por lo anterior y con los resultados obtenidos de los parámetros evaluados se puede validar el método ELFA usando el sistema VIDAS para la determinación de *Salmonella* spp en materias primas usadas para la elaboración de pienso para animales, con la ventaja de que se obtienen resultados fiables en un periodo de tiempo menor que al realizar los análisis por el método tradicional.

6. CONCLUSIONES

- El análisis para la detección de *Salmonella* spp, realizado por el método tradicional permite obtener resultados confiables pero es un proceso bastante largo y solo se obtiene un resultado 5 días después de que se inicia el proceso.
- El análisis para la detección de *Salmonella* spp por el método ELFA, usando el sistema VIDAS, permite obtener un resultado positivo o negativo, 2 días después de iniciado el proceso. Solo cuando se obtienen resultados positivos estos deben ser confirmados con pruebas serológicas y bioquímicas.
- La prueba de identificación bioquímica solo puede detectar el género *Salmonella* y no la especie de la bacteria inoculada de forma intencional a la muestra.
- La similitud entre los resultados obtenidos del análisis de la harina de soya por el método tradicional y por el método ELFA usando el sistema VIDAS, es la prueba de que si se pueden obtener resultados confiables por el método alternativo para el fin previsto.
- La sensibilidad calculada de acuerdo a los resultados obtenidos fue de 90%, es decir que el VIDAS tiene una alta capacidad de detectar un alto número de muestras verdaderamente positivas.
- El valor de sensibilidad (90%) obtenido, es más bajo que el reportado por la casa comercial para otras matrices como productos cárnicos (100%) y lácteos deshidratados (101,5%), este resultado puede deberse a que se realizaron pocos análisis o repeticiones de las pruebas.
- La especificidad calculada fue de 100% es decir que el equipo detecta exactamente el microorganismo de interés aun cuando hay otros microorganismos presentes en la muestra.

- La especificidad del método ELFA usando el sistema VIDAS se evidenció al conocer con las pruebas de identificación bioquímica que las muestras inoculadas con *E. coli*, estaban contaminadas con otros microorganismos y aun así el resultado obtenido fue negativo.
- La eficiencia calculada para el VIDAS es de 95,49%, indicando que se obtiene una alta tasa de aciertos en los resultados de los análisis.
- El análisis de varianza, ANOVA que se realizó a partir de los resultados obtenidos por los dos métodos, señala que no existen diferencias significativas entre los métodos, ($P = 1$) > al ($\alpha = 0,5$) Por lo tanto es posible decir con certeza que si se obtienen resultados confiables.
- Después de comparar los resultados obtenidos por el método de referencia para las pruebas de detección de *Salmonella* spp con los resultados obtenidos por el método alternativo y teniendo en cuenta los resultados satisfactorios obtenidos de los parámetros analizados, se valida el método ELFA usando el sistema VIDAS para la detección de *Salmonella* spp en materia prima usada para la elaboración de piensos para animales.

7. RECOMENDACIONES

Cuando se realicen pruebas de validación de métodos de análisis, es bueno que el número de repeticiones de prueba no sea menor a 10, para garantizar que se tiene suficientes datos para realizar los análisis.

En caso que se requiera conocer el género y la especie de los mismos microorganismos presentes en una muestra, se deben emplear métodos más específicos que el Crystal, el cual a pesar de ser un muy buen sistema de identificación, en algunos casos como ocurrió en el trabajo, a pesar de saber la especie de la bacteria, el resultado fue *Salmonella* spp.

Es importante siempre que se vaya a trabajar con una solución celular o cultivo microbiano, agitar muy bien el tubo para garantizar la homogenización completa y distribución uniforme de las células en el líquido que las contiene, para que al momento de tomar un inóculo se garantice que hay células en el volumen a transferir.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta Castillo, L. E., & Ramírez Huayhuas, F. (2007). Desarrollo y validación prospectiva del método de análisis de valoración de glimipiride 2 mg/rosiglitazona 4 mg tabletas recubiertas por cromatografía líquida de alta performance. Universidad Nacional Mayor De San Marcos Facultad De Farmacia Y Bioquímica. Lima – Perú. Recuperado de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/2254/Acosta_cl.pdf?sequence=1
- A. E. A. S. (2012). Guía para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo de aguas Parte II. Criterios para la validación de los métodos de ensayos físico-químicos y microbiológicos. Recuperado en <http://www.aeas.es/documentos/guiafuncionamientolaboratoriosensayoaguas2.pdf>
- Andreoletti, O., Budka, H., Buncic, S., Colin, P., Collins, J. D., De, A., & Vanopdenbosch, E. (2008). Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *The EFSA J*, 720, 1-84.
- Becton Dickinson. (2013). Bd instrucciones de uso – medios en placa listos para usar. BD BBL™ CHROMagar™ Salmonella
- Becton Dickinson. (2013). Bd instrucciones de uso – medios en placa listos para usar. BD Hektoen Enteric Agar (HE Agar)
- Becton Dickinson. (2013). Bd instrucciones de uso – medios en placa listos para usar. BD XLD Agar (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar).
- BioMérieux. (2015). Diagnóstico Clínico. Productos VIDAS® Actualizado: 08/10/2015. Recuperado de http://www.biomerieux.com.ar/servlet/srt/bio/argentina/dynPage?open=ARG_CLN_PRD&doc=ARG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_4&pubparams.sform=3&lang=es_ar
- Cáceres, R. Á. (2007). *Estadística aplicada a las ciencias de la salud*. Ediciones Díaz de Santos.

- Camaró-Sala, M. L., Martínez-García, R., Olmos-Martínez, P., Catalá-Cuenca, V., Ocete-Mochón, M. D., & Gimeno-Cardona, C. (2014). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- de Blas Beorlegui, C., Mateos, G. G., & Rebollar, P. G. (2003). *Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos*. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- E. A. S. (2012). Guía para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo de aguas Parte I. Criterios para el Aseguramiento de la Calidad de los Ensayos. Recuperado en <http://www.aeas.es/documentos/guiafuncionamientolaboratoriosensayoagua s2.pdf>
- Europeo, P. (2002). Reglamento (CE) Nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de Enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 1-24.
- Figueroa, M. (1984). Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centroamérica. EUNED.
- Flórez, R. (1981). Epizootiología de las Salmonelosis en bovinos, porcinos y aves. *Departamento de Bacteriología, INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES PECUARIAS México DF*.
- Fornés, D. (2008). Validación de métodos microbiológicos alternativos. In *Workshop MRAMA* (No. VII).
- Fornés, D. (2014). Metodología para validación interna de métodos de ensayo microbiológicos alternativos en alimentos. Santiago de Chile. Chile. Recuperado de http://sila.achipia.gob.cl/system/files/upload/repositorio/achipia_validacion_de_metodos_microbiologicos_alternativos_1_0.pdf
- Gil-Setas, A., Mazón Ramos, A., Martín Salas, C., Urtiaga Domínguez, M., & Inza Elía, M. (2002). Salmonelosis no tifoidea en un área de salud de Navarra, España. *Revista española de salud pública*, 76(1), 49-56.

Guía Eurachem (2005). Métodos analíticos adecuados a su propósito. *Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. Copyright LGC (Teddington) Ltd.

ILAC G18:04 (2010). Guideline for the Formulation of Scopes of Accreditation for Laboratories. Recuperado de file:///I:/Users/User/Downloads/ILAC_G18_04_2010.pdf.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION. (2003). GTC 84. Calidad del agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis Microbiológicos. Bogotá, Colombia: Icontec.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION. (2005). IEC 17025. Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Bogotá. ICONTEC

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. INS (2014). Lineamientos Técnicos Para La Estandarización y Validación de Métodos de Ensayo. Dirección Redes en Salud Pública. Bogotá, Colombia. Recuperado en <http://www.saludcapital.gov.co/CTDLab/Publicaciones/Lineamiento%20montaje%20estandarizacion%20y%20validacion.pdf>

Instructivo VIDAS *Salmonella* (SLM), Ref 301702.

Ipharraguerre, I. R. (2006). Utilización de la soja en la alimentación animal: desafíos y oportunidades. In *MERCOSOJA 2006-3* Congreso de Soja del Mercosur. 28 al 30 de Junio de 2006. Rosario, Santa Fe, Argentina*.

Laso Sánchez, J. (2005) Situación de la validación de los ensayos microbiológicos en los laboratorios. Tercer Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. Recuperado en <http://www.gscsal.com/informacion-online/articulos-publicados.html?download=7:situacion-de-la-validacion-de-los-ensayos-microbiologicos-en-los-laboratorios-iberolab-2005>.

Márquez, R. J. A. (2008). Salmonelosis: implicaciones en la salud pública y estrategias de control en sanidad animal. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, (21), 105-114.

Microkit. Cepas Cuantitativas en lenticulas. Cepas WDCM. Laboratorios Microkit. Recuperado de: <http://www.microkit.es/pdf/cepas-cuantitativas.pdf>

NC-ISO 6579 (2008). Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp – Método de referencia. Cuba.

OFICINA DE ACREDITACION GUATEMALA, C.A. (2007). OGA-GEC-016. Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo. Versión 1. Guatemala. Recuperado en <http://oga.org.gt/images/files/File/OGA-GEC-016.pdf>

Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, UNODC. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. http://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_S TNAR41_Ebook_S.pdf

OIE. (2008). Salmonelosis. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Capítulo 2.9.9. Recuperado de http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.09.%20Salmonelosis.pdf.

OMS. (2013). *Salmonella* (no tifoidea). (Nota descriptiva N°139). Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>

Ortega González, M., Rodríguez Martínez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Cualitativos. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 162-176.

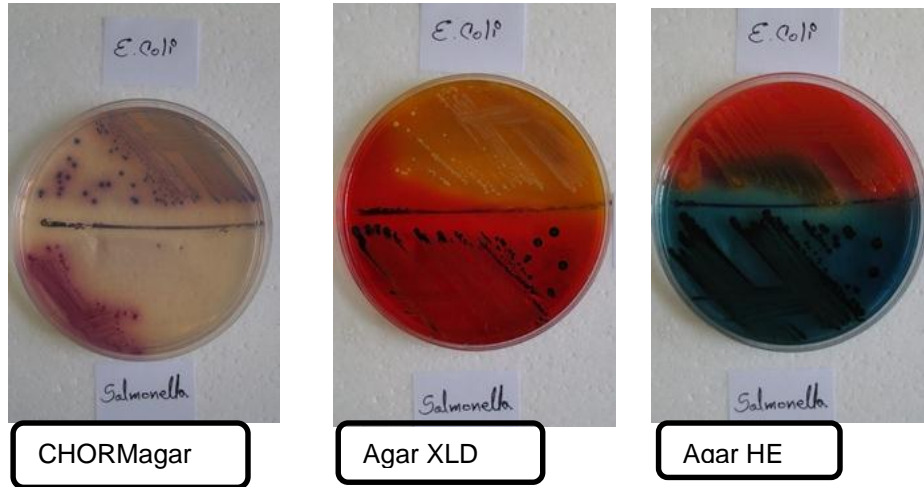
PARRA, M. A. O., & SALAZAR, D. M. R. (2007) Diseño y elaboración de una guía preliminar para la validación de métodos microbiológicos estándar. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis108.pdf>

Valverde, C. (2012). Factores que inciden en la contaminación por " *Salmonella*" en el pienso. *MG Mundo ganadero*, 23(248), 40-46.

XLSTAT. Su solución de análisis de datos. Análisis Detallado de Sensibilidad y Especificidad. Recuperado de: <https://www.xlstat.com/es/soluciones/funciones/analisis-detallado-de-sensibilidad-y-especificidad>

9. ANEXOS

Anexo 1. Prueba de viabilidad de las cepas de trabajo



Anexo 2. Bloque calefactor "heat and Go" con cartuchos VIDAS



Anexo 3. Resultado impreso Estándar y Controles *Salmonella* spp

```
mini VIDAS Informe
LMV LTDA
Sección: A
Terminado: 09:58:33 18Sep15
Téc.: D VILLALOB
Salmonella (SLM)
Ver: R5.6.0
Lote #: 160312-0
Standard usado
Terminado: 09:58:33 18Sep15
RFV = 3951
VT Negativo < 0.23
VT Positivo >= 0.23

Posición: A1 Estándar 1
Ruido de fondo: 142 RFV: 3849

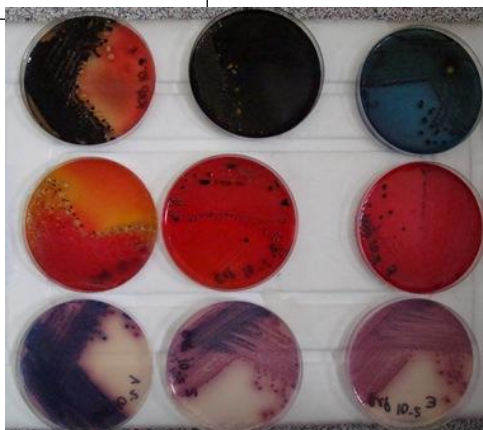
Posición: A2 Estándar 1
Ruido de fondo: 144 RFV: 4053

Posición: A3 Control 1
Ruido de fondo: 141 RFV: 3767
VT: 0.95 Resultado: Positivo

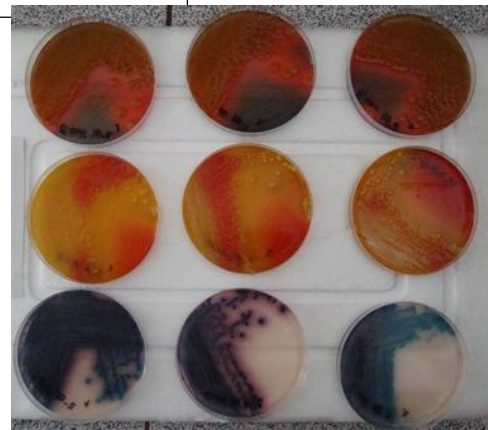
Posición: A4 Control 2
Ruido de fondo: 144 RFV: 71
VT: 0.01 Resultado: Negativo
```

Anexo 4. Colonias de *Salmonella* spp y de *E. coli* en medios de cultivo selectivos

Salmonella spp



E. coli



Anexo 5. Resultados análisis en el equipo mini VIDAS - Método ELFA

A. Control (-) muestra y Control (+) cepa *Salmonella*

```

mini VIDAS Informe
LMV LTDA
Sección: A
Terminado: 17:02:19 18Sep15
Téc.: D VILLALOB
Salmonella (SLM)
Ver: R5.6.0
Lote #: 160312-0
Standard usado
Terminado: 09:58:33 18Sep15
RFV = 3951
VT Negativo < 0.23
VT Positivo >= 0.23

Posición: A1
ID muestra: CTRL(-)MUEST
Ruido de fondo: 145 RFV: 67
VT: 0.01 Resultado: Negativo

Posición: A2
ID muestra: CTRL(-)MUEST
Ruido de fondo: 146 RFV: 62
VT: 0.01 Resultado: Negativo

Posición: A3
ID muestra: CTRL(-)MUEST
Ruido de fondo: 144 RFV: 65
VT: 0.01 Resultado: Negativo

Posición: A4
ID muestra: CTRL(+) 10-1
Ruido de fondo: 145 RFV: 11318
VT: 2.86 Resultado: Positivo

Posición: A5
ID muestra: CTRL(+) 10-2
Ruido de fondo: 141 RFV: 62
VT: 0.01 Resultado: Negativo

Posición: A6
ID muestra: CTRL(+) 10-3
Ruido de fondo: 141 RFV: 59
VT: 0.01 Resultado: Negativo
    
```

B. Muestra problema

```

mini VIDAS Informe
LMV LTDA
Sección: B
Terminado: 17:02:51 18Sep15
Téc.: D VILLALOB
Salmonella (SLM)
Ver: R5.6.0
Lote #: 160312-0
Standard usado
Terminado: 09:58:33 18Sep15
RFV = 3951
VT Negativo < 0.23
VT Positivo >= 0.23

Posición: B1
ID muestra: SALM 10-1
Ruido de fondo: 140 RFV: 11619
VT: 2.94 Resultado: Positivo

Posición: B2
ID muestra: SALM 10-1
Ruido de fondo: 140 RFV: 11534
VT: 2.91 Resultado: Positivo

Posición: B3
ID muestra: SALM 10-1
Ruido de fondo: 140 RFV: 11522
VT: 2.91 Resultado: Positivo

Posición: B4
ID muestra: SALM 10-2
Ruido de fondo: 138 RFV: 10791
VT: 2.73 Resultado: Positivo

Posición: B5
ID muestra: SALM 10-2
Ruido de fondo: 138 RFV: 11170
VT: 2.82 Resultado: Positivo

Posición: B6
ID muestra: SALM 10-2
Ruido de fondo: 138 RFV: 10960
VT: 2.74 Resultado: Positivo
    
```

C. Muestra problema y Control negativo muestra *E. coli*

```

mini VIDAS Informe
LMV LTDA
Sección: A
Terminado: 18:28:53 18Sep15
Téc.: D VILLALOB
Salmonella (SLM)
Ver: R5.6.0
Lote #: 160312-0
Standard usado
Terminado: 09:58:33 18Sep15
RFV = 3951
VT Negativo < 0.23
VT Positivo >= 0.23

Posición: A1
ID muestra: SALM 10-3
Ruido de fondo: 149 RFV: 55
VT: 0.01 Resultado: Negativo

Posición: A2
ID muestra: SALM 10-3
Ruido de fondo: 149 RFV: 11365
VT: 2.87 Resultado: Positivo

Posición: A3
ID muestra: SALM 10-3
Ruido de fondo: 148 RFV: 11811
VT: 2.98 Resultado: Positivo

Posición: A4
ID muestra: E COLI 10-1
Ruido de fondo: 148 RFV: 56
VT: 0.01 Resultado: Negativo

Posición: A5
ID muestra: E COLI 10-1
Ruido de fondo: 143 RFV: 58
VT: 0.01 Resultado: Negativo

Posición: A6
ID muestra: E COLI 10-1
Ruido de fondo: 146 RFV: 57
VT: 0.01 Resultado: Negativo
    
```

```

mini VIDAS Informe
LMV LTDA
Sección: B
Terminado: 18:29:31 18Sep15
Téc.: D VILLALOB
Salmonella (SLM)
Ver: R5.6.0
Lote #: 160312-0
Standard usado
Terminado: 09:58:33 18Sep15
RFV = 3951
VT Negativo < 0.23
VT Positivo >= 0.23

Posición: B1
ID muestra: E COLI 10-2
Ruido de fondo: 147 RFV: 62
VT: 0.01 Resultado: Negativo

Posición: B2
ID muestra: E COLI 10-2
Ruido de fondo: 143 RFV: 57
VT: 0.01 Resultado: Negativo

Posición: B3
ID muestra: E COLI 10-2
Ruido de fondo: 144 RFV: 60
VT: 0.01 Resultado: Negativo

Posición: B4
ID muestra: E COLI 10-3
Ruido de fondo: 143 RFV: 69
VT: 0.01 Resultado: Negativo

Posición: B5
ID muestra: E COLI 10-3
Ruido de fondo: 143 RFV: 55
VT: 0.01 Resultado: Negativo

Posición: B6
ID muestra: E COLI 10-3
Ruido de fondo: 143 RFV: 59
VT: 0.01 Resultado: Negativo
    
```