

Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana

## PRESENTACIÓN DE UN MÉTODO RÁPIDO PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS

Virginia Leyva Castillo<sup>1¶</sup>, Yamila Puig Peña<sup>2¶</sup>, Yaumara Ferrer Márquez<sup>3¶</sup>, Addiel Hernández Linares<sup>4‡</sup>, Neibys Aportela López<sup>5¶</sup>, Zuleidis Hechavarría Aguinar<sup>6¶</sup>.

### RESUMEN

**Introducción:** El aumento de la producción alimentaria en Cuba requiere de métodos rápidos de análisis microbiológico que emitan resultados en el menor tiempo posible. **Objetivo:** Evaluar la utilidad del *kit* “Food System” (Liofilchem, Italia) para el análisis microbiológico rápido de alimentos en los laboratorios de la red nacional de salud. **Métodos:** Se evaluaron las características operacionales de 78 *kits* empleados en el análisis de 156 muestras de alimentos respecto de las de los métodos existentes en el Instituto de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM) de La Habana (Cuba) según la norma ISO 16140-2:2016 [International Standards Organization. Geneva: 2016]. **Resultados:** La fortaleza diagnóstica del *kit* “Food System” fue desigual y dependiente del alimento a ensayar y el germen a detectar en un escenario de baja contaminación microbiana. La exactitud diagnóstica de la detección de 4 especies patógenas no fue diferente de la esperada bajo la influencia del azar. **Conclusiones:** El *kit* “Food System” debería emplearse en la determinación de microorganismos patógenos con criterios cualitativos en aquellos casos de alimentos con carga microbiana importante, siempre y cuando el uso del *kit* se ajuste a las normas vigentes en el país para el análisis de la inocuidad de alimentos. **Recomendaciones:** Evaluar el desempeño del *kit* “Food System” en situaciones de elevada carga microbiana. **Leyva Castillo V, Puig Peña Y, Ferrer Márquez Y, Hernández Linares A, Aportela López N, Hechavarría Aguinar Z.** Presentación de un método rápido para el análisis microbiológico de los alimentos. RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2019;29(2):299-311. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929.

Palabras clave: *Diagnóstico rápido / Microbiología / Alimentos / Seguridad alimentaria.*

<sup>1</sup> Bioquímica. Especialista en Microbiología. Máster en Enfermedades Infecciosas. Investigador auxiliar. Profesor auxiliar. Departamento de Laboratorios. Jefa de Sección. <sup>2</sup> Médico Especialista en Microbiología, Máster en Nutrición en Salud Pública. Máster en Enfermedades Infecciosas. Investigador auxiliar. Profesor auxiliar.

<sup>3</sup> Licenciada en Nutrición y Dietética. Investigador auxiliar. Departamento de Laboratorios. Sección de Microbiología Sanitaria. <sup>4</sup> Licenciado en Ciencia de los Alimentos. <sup>5</sup> Licenciado en Ciencia de los Alimentos. Investigadora agregada. Departamento de Laboratorios. Sección de Microbiología Sanitaria. <sup>6</sup> Licenciado en Microbiología. Tecnología de la Salud. Aspirante a Investigador. Departamento de Laboratorios. Sección de Microbiología Sanitaria.

¶ Sección de Microbiología Sanitaria. Instituto de Higiene, Epidemiología y Microbiología de La Habana. ‡ Instituto de Farmacia y Alimentos de La Habana.

Recibido: 4 de Julio del 2019. Aceptado: 12 de Septiembre del 2019.

Virginia Leyva Castillo. Sección de Microbiología Sanitaria. Departamento de Laboratorios. Instituto de Higiene, Epidemiología y Microbiología de los Alimentos de La Habana. Infanta #1134 esquina a Manglar. Centro Habana. La Habana.

Correo electrónico: [villy@inhem.sld.cu](mailto:villy@inhem.sld.cu).

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen un problema de salud a nivel global en el mundo contemporáneo. Por este motivo ha aumentado la preocupación por el consumo de alimentos inocuos, lo que ha llevado al fortalecimiento de las actividades de control de calidad de los mismos mediante el empleo de métodos de laboratorio cada vez más exigentes.<sup>1</sup> Lo anterior no debe estar reñido con el tiempo de demora en la emisión de los resultados, y siempre es deseable que el método de análisis en cuestión garantice resultados rápidos en correspondencia con las exigencias del comercio y el incremento de las regulaciones sanitarias en muchas regiones y países. Se tienen ejemplos de lo anterior en la “Ley de Modernización de Seguridad alimentaria” de los EEUU,<sup>2</sup> y el “Plan de Acción de Seguridad alimentaria” de China.<sup>3</sup> Por otro lado, Cuba es signataria de un acuerdo de seguridad alimentaria en el espacio la Comunidad de Estados Latinoamericanos y del Caribe (CELAC) desde enero del 2016.<sup>4</sup>

En Cuba se asiste a un incremento considerable de la apertura e implementación de mini-industrias orientadas a la producción de alimentos, la preparación y servido de alimentos por actores estatales y paraestatales (léase también “cuentapropistas”); y la importación de alimentos, lo que se traslada a un aumento de las demandas de solicitud de análisis microbiológico que se le hacen al Registro Sanitario de Alimentos del país para la expedición de los correspondientes permisos de comercialización.<sup>5</sup> El Programa nacional de Vigilancia Sanitaria que conduce la Dirección Nacional de Salud Ambiental del Ministerio de Salud Pública (MINSAP) es otra instancia gubernamental que solicita estudios microbiológicos de los alimentos en el país.<sup>6</sup>

En la actualidad se utilizan en la red nacional de laboratorios de análisis microbiológico de alimentos del MINSAP métodos basados en la siembra y monitoreo del crecimiento de los especímenes problemas en placas de cultivo. Tales métodos, aunque normalizados, requieren de una importante carga instrumental y tecnológica, medios de cultivo, y reactivos de variado tipo, así como de capital humano calificado. El tiempo de completamiento de estos ensayos es prolongado, y con ello, tiempos diferidos de obtención de los resultados definitivos. Por tal motivo, se necesitan métodos rápidos de ensayo que permitan, en el menor tiempo posible y con la mayor exactitud, la detección, el recuento, la caracterización y la subtipificación de los microorganismos de interés sanitario.<sup>7</sup>

En virtud de lo anteriormente expuesto, el Laboratorio de “Microbiología de los Alimentos” del Instituto Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología (INHEM) de La Habana (Cuba) ha realizado estudios para determinar la factibilidad del uso de *kits* de análisis microbiológico rápido para la detección de *Listeria* spp. y *Salmonella* spp.,<sup>8</sup> *Listeria*,<sup>9</sup> y *Salmonella*.<sup>10</sup>

El laboratorio de pertenencia de los autores ha avanzado como política contar con todo un espectro amplio de opciones diagnósticas llegado el momento del análisis microbiológico de alimentos. Por ello, se ha completado la presente investigación que ha tenido como objetivo evaluar la utilidad del *kit* de análisis microbiológico rápido “Food System” (Liofilchem Diagnostic, Italia) para el control microbiológico de los alimentos en los laboratorios de la red nacional de salud.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Descripción del kit de análisis microbiológico rápido:** El *kit* “Food System” es un método que ofrece hasta 24 pocillos rellenos con medios de cultivos contentivos de sustratos bioquímicos

apropiados para el diagnóstico presuntivo de microorganismos especificados como *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus*, *Echerichia coli*, *Proteus/Providencia* spp., *Pseudomonas* spp., y *Bacillus cereus*.<sup>11</sup> Como tal, el kit “Food System” se corresponde con un método cualitativo de detección de microorganismos. Otras bacterias que se pueden detectar mediante el kit “Food System” son *Proteus/Providencia* spp. y *Pseudomonas* spp.;<sup>11</sup> pero se ha de aclarar que estos gérmenes no se encuentran dentro de los criterios microbiológicos avanzados para evaluar la calidad e inocuidad de los alimentos.

El kit “Food System” también detecta *Bacillus cereus* y hongos,<sup>11</sup> microorganismos que se evalúan en alimentos específicos en Cuba según la norma NC 585 (La Habana: 2017),<sup>12</sup> y de acuerdo con los criterios cuantitativos. solo la detección de estos microorganismos en los alimentos no es válido para evaluar la calidad del producto.<sup>12</sup>

**Locación del estudio:** Laboratorio de “Microbiología sanitaria”, del Instituto de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM) de La Habana (Cuba).

**Diseño del estudio:** Estudio de comparación de métodos. El kit “Food System” se empleó en la identificación de las especies microbianas presentes en 156 productos alimenticios procedentes del “Registro de Alimentos” del INHEM, entre Enero – Mayo del 2017 (ambos meses también incluidos). Los productos alimenticios ensayados fueron representativos de los grupos de alimentos que se analizan con mayor frecuencia en el laboratorio, a saber (en orden descendente): *Carnes y derivados*: 107 productos; *Leche y productos lácteos*: 28; y *Otros alimentos*: 21; respectivamente.

El kit “Food System” se implementó en el laboratorio de pertenencia de los autores siguiendo rigurosamente las

indicaciones del productor, y los microorganismos se determinaron a partir de la dilución inicial de la muestra del alimento. Los resultados del kit se trataron siguiendo la metodología expuesta en la norma ISO 16140-2:2016.<sup>13</sup>

Las muestras de alimentos se ensayaron en paralelo con el método vigente en el laboratorio según las normas vigentes en el país para el análisis de alimentos. Así, la detección de *Salmonella* se hizo mediante la NC ISO 6579:2008,<sup>14</sup> la de *Listeria monocytogenes* según la NC-ISO 11290-1:2014,<sup>15</sup> *Escherichia coli* por la NC ISO 16649-2:2013;<sup>16</sup> y la de *Staphylococcus* coagulasa- positivo de acuerdo con la NC ISO 6888-1:2003.<sup>17</sup> Los ensayos de laboratorio fueron hechos por un técnico debidamente capacitado y entrenado.

La expresión bioquímica y fisiológica de las bacterias objeto de análisis con el kit rápido “Food System” se verificó mediante cepas de referencia suministradas por el cepario del Laboratorio de “Control de la calidad de Microbiología” del antes citado INHEM, a saber: *Listeria monocytogenes* ATCC19116, *Salmonella typhimurium* ATCC14028, y *Escherichia coli* ATCC 25922. Se comprobó que la expresión bioquímica y fisiológica de las cepas de referencia ensayadas con el kit se correspondiera con lo declarado por el productor del kit.

**Procesamiento de los datos y análisis estadístico-matemático de los resultados:** Los resultados de los ensayos completados, y los microorganismos detectados en las muestras procesadas de alimentos, se ingresaron en una hoja de cálculo electrónica construida sobre EXCEL para OFFICE de WINDOWS (Microsoft, Redmon, Virginia, Estados Unidos). Teniendo como referencia el resultado emitido por el método microbiológico vigente en el laboratorio de ensayo, se estimaron la sensibilidad, la especificidad y la exactitud diagnósticas del kit “Food System”.<sup>18</sup> Brevemente, se

calcularon las cantidades DP: Acuerdos positivos: positividads encontradas con el *kit*; AP: Desviaciones positivas: positividads encontradas con el método microbiológico; AN: Acuerdos negativos =  $\{N - (AP + DP)\}$ ; y DN: Desviaciones negativas =  $\{N - (AP + DP + AN)\}$ . En las expresiones anteriores: N: Número de muestras ensayadas =  $\{AP + AN + DP + DN\}$ . A su vez, las características operacionales del *kit* “Food System” se estimaron como sigue:

$$\text{Sensibilidad} = (AP * 100) / (AP + DN) \quad [1]$$

$$\text{Especificidad} = (AN * 100) / (DP + AN) \quad [2]$$

$$\text{Exactitud} = (AP + AN) * 100 / (AP + DN + DP + AN) \quad [3]$$

La concordancia (léase también acuerdo) entre los dos métodos de análisis microbiológico se estimó mediante el coeficiente  $\kappa$  (kappa).<sup>19</sup> Se empleó un valor  $\kappa \geq 0.6$  para denotar la concordancia como “Aceptable”. Adicionalmente, la fortaleza de la concordancia fue denotada como: *Ausente*:  $\kappa < 0.10$ ; *Débil*:  $0.10 \leq \kappa \leq 0.40$ ; *Justa*:  $0.40 < \kappa \leq 0.60$ ; *Fuerte*:  $0.60 < \kappa \leq 0.80$ ; y *Casi completo*:  $0.80 < \kappa \leq 1.00$ ; respectivamente.

## RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los hallazgos encontrados después del uso de los métodos de detección de los microorganismos de interés sanitario. El ensayo se limitó a la detección de 4 microorganismos de interés sanitario, a saber: *Salmonella* spp., *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, y *Listeria*

spp. Las positividads encontradas con los métodos microbiológicos vigentes en el laboratorio de pertenencia de los autores del trabajo fueron como sigue: *Salmonella* spp.: 5.8%; *Staphylococcus*: 7.1%; *Escherichia coli*: 3.2%; y *Listeria* spp.: 1.3%; respectivamente. Por su parte, la capacidad de detección del *kit* “Food System” fue mayor: *Salmonella* spp.: 34.6% ( $\Delta = +28.8\%$ ); *Staphylococcus*: 66.0% ( $\Delta = +58.9\%$ ); *Escherichia coli*: 12.8 % ( $\Delta = +9.6\%$ ) y *Listeria* spp.: 46.8 % ( $\Delta = +45.5\%$ ); respectivamente.

La distribución de las positividads según el germen y el grupo de alimentos ensayado fue desigual, no importa el método empleado. Las carnes y los derivados concentraron la mayoría de las positividads a *Salmonella* spp. y *Listeria* spp.: *Salmonella* spp: Método microbiológico: 8.4% vs. *Kit* “Food System”: 48.7% ( $\Delta = +40.3\%$ ); y *Listeria* spp.: Método microbiológico: 1.9% vs. *Kit* “Food System”: 53.3% ( $\Delta = +51.4\%$ ). Por el contrario, las positividads a *Staphylococcus* fueron predominantes en las muestras de leche y los derivados: Método microbiológico: 9.3% vs. *Kit* “Food System”: 58.9% ( $\Delta = +49.6\%$ ). En el caso de *Escherichia coli*, las positividads fueron mayores en la categoría “Otros alimentos”: Método microbiológico: 0.0% vs. *Kit* “Food System”: 32.1% ( $\Delta = +32.1\%$ ).

La Tabla 2 muestra la concordancia entre los métodos empleados en la detección de *Salmonella* spp. La tasa de concordancia (léase también exactitud) global *para-todos-los-alimentos* fue del 65.4% (Coeficiente  $\kappa = 0.61$ ). De acuerdo con el grupo de alimentos ensayado, la tasa de concordancia ajustada fue como sigue: *Carnes y derivados*: 51.4% ( $\kappa = 0.42$ ); *Leche y derivados*: 100.0% ( $\kappa = 1.00$ ); y *Otros alimentos*: 90.5% ( $\kappa = 0.91$ ); respectivamente.

Tabla 1. Resultados de la detección de los microorganismos de interés en los alimentos seleccionados mediante el *kit* “Food System” (Liofilchem, Italia) y los métodos microbiológicos normalizados. Se muestran el número y [entre corchetes] el porcentaje de muestras de los alimentos en las que se identificó el germen en cuestión.

Microorganismo	Grupo de alimentos	Método de detección	
		<i>Kit</i> “Food System”	Métodos microbiológicos
<i>Salmonella</i> spp.	Carnes y derivados	52 [48.7]	9 [8.4]
	Leche y derivados	0 [ 0.0]	0 [0.0]
	Otros alimentos	2 [ 9.5]	0 [0.0]
	<i>Todos</i>	54 [34.6]	9 [5.8]
<i>Staphylococcus</i>	Carnes y derivados	63 [58.9]	10 [9.3]
	Leche y derivados	26 [92.9]	0 [0.0]
	Otros alimentos	14 [66.7]	1 [4.8]
	<i>Todos</i>	103 [66.0]	11 [7.1]
<i>Escherichia coli</i>	Carnes y derivados	9 [ 8.4]	5 [4.7]
	Leche y derivados	2 [ 7.1]	0 [0.0]
	Otros alimentos	9 [32.1]	0 [0.0]
	<i>Todos</i>	20 [12.8]	5 [3.2]
<i>Listeria</i> spp.	Carnes y derivados	57 [53.3]	2 [1.9]
	Leche y derivados	14 [50.0]	0 [0.0]
	Otros alimentos	2 [ 9.5]	0 [0.0]
	<i>Todos</i>	73 [46.8]	2 [1.3]

Tamaño de la serie: 156.

Fuente: Registros del estudio.

La sensibilidad (entendida como la capacidad de encontrar “positivos” de *Salmonella* spp.) del *kit* “Food System” fue desigual: *Carnes y derivados*: 100.0%; *Leche y derivados*: 0.0%; y *Otros alimentos*: 0.0%; respectivamente.

La Tabla 3 muestra las características operacionales de los métodos objeto de comparación en la detección de *Staphylococcus*. La tasa de concordancia global fue del 34.0% ( $\kappa = 0.21$ ): inferior a la observada en el caso de *Salmonella* spp. De acuerdo con el alimento ensayado, esta concordancia se comportó como sigue: *Carnes y derivados*: 41.1% ( $\kappa = 0.29$ ); *Leche y derivados*: 7.1% ( $\kappa = 0.07$ ); *Otros alimentos*: 33.3% ( $\kappa = 0.26$ ); respectivamente. De forma similar a lo constatado más arriba, la sensibilidad (esto es: la capacidad de encontrar “positivos” de

*Staphylococcus*) del *kit* “Food System” fue desigual: *Carnes y derivados*: 100.0%; *Leche y derivados*: 0.0%; y *Otros alimentos*: 100.0%; respectivamente.

La Tabla 4 presenta las características operacionales estimadas para la detección de *Escherichia coli* en los alimentos de interés sanitario. La tasa de concordancia intermétodo *para-todos-los-alimentos* fue del 84.0% ( $\kappa = 0.80$ ). De acuerdo con el grupo de alimentos, esta tasa se comportó como sigue: *Carnes y derivados*: 86.9% ( $\kappa = 0.85$ ); *Leche y derivados*: 92.9% ( $\kappa = 0.81$ ); y *Otros alimentos*: 57.1% ( $\kappa = 0.57$ ); respectivamente. La sensibilidad propia del *kit* “Food System” en la detección de *Escherichia coli* no superó la esperada de la presencia del puro azar: *Carnes y derivados*: 50.0%; *Leche y derivados*: 0.0%; y *Otros alimentos*: 0.0%; respectivamente.

Tabla 2. Comportamiento del *kit* “Food System” en la detección de *Salmonella* spp. en los alimentos seleccionados. Leyenda: AP: acuerdos positivos. AN: acuerdos negativos. DN: desviaciones negativas. DP: desviaciones positivas. Sens: Sensibilidad. Espec: Especificidad. Exact: Exactitud.  $\kappa$ : coeficiente kappa de Cohen. Para más detalles: Consulte la sección “Material y método” de este artículo.

Matriz de ensayo	N	AP	AN	DN	DP	AP + DN	Sensibilidad %	AN + DP	Especificidad %	Exactitud %	$\kappa$
Carnes y derivados	107	9	46	0	52	9	100.0	98	46.9	51.4	0.42
Leche y derivados	28	0	28	0	0	0	0.0	28	100.0	100.0	1.00
Otros alimentos	21	0	19	0	2	0	0.0	21	90.5	90.5	0.91
Todos los alimentos	156	9	93	0	54	9	100.0	147	63.3	65.4	0.61

Tamaño de la serie: 156.

Fuente: Registros del estudio.

Finalmente, la Tabla 5 exhibe las características operacionales de la detección de *Listeria* spp. La tasa de concordancia intermétodo fue del 53.2% ( $\kappa = 0.39$ ). De forma similar a lo apuntado en los casos expuestos anteriormente, la tasa de concordancia intermétodo fue dependiente del grupo de alimentos ensayado: *Carnes y derivados*: 46.7% ( $\kappa = 0.44$ ); *Leche y derivados*: 50.0% ( $\kappa = 0.50$ ); y *Otros alimentos*: 90.5% ( $\kappa = 0.90$ ); respectivamente. Reproduciendo el patrón encontrado en los otros casos, la sensibilidad del *kit* “Fod System” fue desigual: *Carnes y derivados*: 100.0%; *Leche y derivados*: 0.0%; y *Otros alimentos*: 100.0%; respectivamente.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo ha expuesto el comportamiento operacional de un método rápido en la detección de 4 gérmenes de interés sanitario en grupos de alimentos seleccionados por el impacto que tienen en la alimentación de personas y colectividades. Se esperaba que el *kit* identificara, si no todos (esto es: el 100.0% de las veces), al menos la mayoría (95% o más de las veces)

de los gérmenes presentes en la muestra de uno de los alimentos. Igualmente, se deseaba que el *kit* no emitiera respuesta en caso de que el germen estuviera ausente de la muestra.

Respecto de la primera hipótesis (léase también esperanza), la sensibilidad diagnóstica del *kit* fue desigual, sin importar el germen o el alimento ensayado. Se constataron instancias en que el *kit* falló en detectar gérmenes identificados mediante los métodos microbiológicos. La sensibilidad del *kit* se acompañó de una baja especificidad diagnóstica al emitir respuestas cuando el germen en cuestión no estaba presente. Globalmente, la exactitud diagnóstica del *kit* (el compendio de las características operacionales antes discutidas) no fue diferente de la que marca el azar.

Las características operacionales del *kit* “Food System” merecen ser revisadas en vistas de que la presencia de gérmenes en los alimentos ensayados fue baja, y nunca superó el 10% de positividad con el uso de los métodos microbiológicos (que sirvieron de referencia). Se hace notar que la detección de *Salmonella* en productos lácteos en Cuba es poco frecuente.

Tabla 3. Comportamiento del *kit* “Food System” en la detección de *Staphylococcus* en los alimentos seleccionados. Leyenda: AP: acuerdos positivos. AN: acuerdos negativos. DN: desviaciones negativas. DP: desviaciones positivas. Sens: Sensibilidad. Espec: Especificidad. Exact: Exactitud.  $\kappa$ : coeficiente kappa de Cohen. Para más detalles: Consulte la sección “Material y método” de este artículo.

Matriz de ensayo	N	AP	AN	DN	DP	AP + DN	Sensibilidad %	AN + DP	Especificidad %	Exactitud %	$\kappa$
Carnes y derivados	107	10	34	0	63	10	100.0	97	35.1	41.1	0.29
Leche y derivados	28	0	2	0	26	0	0.0	28	7.1	7.1	0.07
Otros alimentos	21	1	6	0	14	1	100.0	20	30.0	33.3	0.26
Todos los alimentos	156	11	42	0	103	11	100.0	145	29.0	34.0	0.21

Tamaño de la serie: 156.

Fuente: Registros del estudio.

Las características operacionales del *kit* “Food System” podrían ser las propias de un método cualitativo que ofrece reacciones bioquímicas de identificación de un germen. En tal sentido, el *kit* podría afectarse por reacciones inespecíficas e interferencias desarrolladas por bacterias comensales en el alimento de ensayo. Ello podría explicar la (elevada) sensibilidad diagnóstica del *kit* en la detección de *Salmonella* spp. en las carnes y derivados. En este punto, entre el 4.0 – 6.0% de los aislamientos de *Salmonella* spp. que podrían contaminar un alimento son lisina-negativas,<sup>19</sup> los que precisamente no son detectados por el método rápido examinado en este ensayo.

En la bibliografía consultada se encontraron estudios de evaluación de métodos rápidos para la detección de *Salmonella* en alimentos. Así, se tiene el reporte de un método alternativo basado en la reacción de la polimerasa de cadenas (PCR) empleado en la identificación de este germen en embutidos, cereales, y superficies inertes, y con el que se logró un coeficiente  $k$  elevado con los métodos microbiológicos.<sup>20</sup> Un segundo trabajo evaluó también un método PCR en el análisis de *Salmonella* en muestras de alimentos, agua, y el ambiente,

logrando una exactitud > 90%.<sup>21</sup> Una tercera investigación desarrollada por Arroyo y colaboradores encontró que la exactitud diagnóstica de métodos rápidos (Assurance GDS System, BioControl Systems, Estados Unidos) e inmunoenzimáticos (VIA TECRA, TECRA Elisa 3M, Alemania) fue mayor del 80% en la detección de *Salmonella*.<sup>22</sup>

Lo mismo podría argumentarse del desempeño del *kit* “Food System” en la detección de *Listeria* spp. en los alimentos de interés de las investigadoras. El control sanitario de *Salmonella* spp. y *Listeria* spp. se hace en base a criterios cualitativos binarios (Ausente/Presente). La presencia de microorganismos comensales podría interferir en los sistemas bioquímicos de identificación de tales gérmenes, alterando así las características operacionales del *kit*. Las positividads a *Listeria* spp. observadas con el *kit* en el análisis de muestras de carnes y derivados fueron para todo el género. En contraste, el método microbiológico identificó sendas especies de *L. monocytogenes* y *L. welshimeri*. Las normativas de evaluación microbiológica de alimentos en Cuba establecen *L. monocytogenes* como especie patógena, y es

por ello que es importante la detección de la especie, y no solo el género, prestación que no cubre el *kit*. Otros autores también han informado de la falla del *kit* “Food System” en la detección de *Listeria* spp. en alimentos listos para el consumo, razón por la cual han concluido que este método rápido no es confiable para estos propósitos.<sup>23-24</sup>

métodos microbiológicos);<sup>26</sup> resultados que se tomaron como evidencia de una mayor sensibilidad diagnóstica del método rápido.

El *kit* “Food System” se empleó también en la identificación cualitativa de *Staphylococcus* y *Echerichia coli*. Independientemente de que los criterios de aceptabilidad sanitaria de un alimento se

Tabla 4. Comportamiento del *kit* “Food System” en la detección de *Escherichia coli* en los alimentos seleccionados. Leyenda: AP: acuerdos positivos. AN: acuerdos negativos. DN: desviaciones negativas. DP: desviaciones positivas. Sens: Sensibilidad. Espec: Especificidad. Exact: Exactitud.  $\kappa$ : coeficiente kappa de Cohen. Para más detalles: Consulte la sección “Material y método” de este artículo.

Matriz de ensayo	N	AP	AN	DN	DP	AP + DN	Sensibilidad %	AN + DP	Especificidad %	Exactitud %	$\kappa$
Carnes y derivados	107	5	88	5	9	10	50.0	97	90.7	86.9	0.85
Leche y derivados	28	0	26	0	2	0	0.0	28	92.9	92.9	0.81
Otros alimentos	21	0	12	0	9	0	0.0	21	57.1	57.1	0.57
Todos los alimentos	156	5	126	5	20	10	50.0	146	86.3	84.0	0.80

Tamaño de la serie: 156.

Fuente: Registros del estudio.

El uso de un *kit* GeneQuence® (Neogen, Estados Unidos) no detectó *L. monocytogenes* en muestras de queso fresco artesanal producidas en Cuba.<sup>8</sup> Por el contrario, la aplicación de este *kit* en la identificación de la presencia de *L. monocytogenes* en canales porcinas en el Perú fue seguida de una exactitud diagnóstica mayor del 90.0% (*Sensibilidad*: 96.2% vs. *Especificidad*: 100.0%).<sup>25</sup>

Se han empleado métodos inmunológicos en la determinación de *Listeria* spp. en quesos y embutidos comercializados en Cuba.<sup>9</sup> El uso de un *kit* OXOID reveló la presencia de *Listeria* spp. en tres muestras de productos cárnicos, sin que se lograra aislamiento por los métodos tradicionales;<sup>9</sup> así como en hortalizas frescas (sólo se logró un aislamiento por los

basan en la cuantificación de las especies microbianas presentes, como quiera que para éstos son microorganismos frecuentes en las inspecciones de vigilancia de la red nacional, las autoras percibieron que el *kit* pudiera ser útil cuando el criterio propuesto por el productor para la aceptación sanitaria de un alimento es (precisamente) la ausencia del microorganismo.

En este punto se consideró como límite de detección de la técnica tradicional para determinar la presencia de *Staphylococcus* la cota de 10<sup>2</sup> UFC por cada gramo (mililitro) de muestra. La norma cubana abarca la detección de tanto *Staphylococcus aureus* como de otras especies de *Staphylococcus* coagulasa-positivo que pueden ser productoras de toxinas y causas por lo tanto de brotes alimentarios. El productor del *kit*

no declara límite de detección para *Staphylococcus*, y establece que el método rápido solo determina *Staphylococcus aureus*; eventos éstos que pudieran generar sesgos durante la evaluación de la inocuidad de productos alimenticios.

negatividad a *Escherichia coli* de una muestra con un método rápido no implica forzosamente la ausencia del microorganismo, y se ha imperativa la confirmación del resultado con técnicas jerárquicamente superiores, sobre todo si

Tabla 5. Comportamiento del kit "Food System" en la detección de *Listeria* spp. en los alimentos seleccionados. Leyenda: AP: acuerdos positivos. AN: acuerdos negativos. DN: desviaciones negativas. DP: desviaciones positivas. Sens: Sensibilidad. Espec: Especificidad. Exact: Exactitud.  $\kappa$ : coeficiente kappa de Cohen. Para más detalles: Consulte la sección "Material y método" de este artículo

Matriz de ensayo	N	AP	AN	DN	DP	AP + DN	Sensibilidad %	AN + DP	Especificidad %	Exactitud %	$\kappa$
Carnes y derivados	107	2	48	0	57	2	100.0	105	45.7	46.7	0.44
Leche y derivados	28	0	14	0	14	0	0.0	28	50.0	50.0	0.50
Otros alimentos	21	0	19	0	2	0	0.0	21	90.5	90.5	0.90
Todos los alimentos	156	2	81	0	73	2	100.0	154	52.6	53.2	0.39

Tamaño de la serie: 156.

Fuente: Registros del estudio.

Se han obtenido resultados aceptables en la determinación de *Staphylococcus aureus* mediante métodos rápidos cuantitativos como el medio cromogénico BBL CHROMagar *Staph aureus* (BD Biosciences, Estados Unidos);<sup>27</sup> así como de *Staphylococcus enterotoxigénicos* con el sistema inmunoenzimático VIDAS Staph enterotoxin II (SET 2).<sup>28</sup> Sin embargo, y en contraste con los resultados expuestos más arriba, la detección de *Staphylococcus coagulasa-positivo* en esta investigación fue poco sensible e inespecífica en las diferentes matrices de ensayo.

En lo tocante a *Escherichia coli*, el límite de detección del método microbiológico es de 10 UFC/g(mL). Como quiera que el kit "Food System" es un método cualitativo, se desconoce el límite de detección del mismo para establecer la presencia de *Escherichia coli* en las muestras, y ello pudo haber incidido en el comportamiento operacional del kit. La

trata de alimentos listos para el consumo.

Existen métodos rápidos cuantitativos que pudieran constituirse en una alternativa futura para la detección segura de *Escherichia coli*. Broquet *et al.* (2007) evaluaron los sistemas TEMPOR y Petrifilm™ *E.coli-Coliformes* para la enumeración de bacterias coliformes y *E. coli* en muestras de carnes y productos cárnicos.<sup>29</sup> La concordancia intermétodo fue elevada: *Materia prima cárnica*: 93.0%; *Jamones*: 95.0%; *Salchichas*: 94.0%; y *Muestras ambientales*: 97.0%; respectivamente.<sup>29</sup> Los resultados obtenidos fueron comparables, y se obtuvieron en  $\leq 24$  horas.<sup>29</sup> El Laboratorio de "Microbiología sanitaria" (INHEM), donde se desempeñan las autoras, cuenta con el medio cromogénico TBX de triptona-bilis-ácido glucurónico (Biolife, Italia) que permite un diagnóstico cuantitativo rápido y altamente específico en  $\leq 24$  horas.<sup>16</sup>

## CONCLUSIONES

La fortaleza diagnóstica del *kit* “Food System” como método alternativo en la detección de microorganismos de interés sanitario fue desigual, y dependiente de tanto el alimento a ensayar como el germen a detectar. El *kit* no identifica (por propia definición del diseño analítico) aquellas especies consideradas como altamente nocivas para la salud humana. El pobre desempeño del *kit* en la detección con fines cualitativos de gérmenes como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* reafirma las limitaciones del empleo del mismo en situaciones que requieren criterios cuantitativos para la evaluación de la inocuidad de alimentos listos para el consumo. El *kit* “Food System” debería emplearse en la determinación de microorganismos patógenos con criterios cualitativos en aquellos casos de alimentos con carga microbiana importante, siempre y cuando el uso del *kit* se ajuste a las normas vigentes en el país para el análisis de la inocuidad de alimentos.

### *Futuras extensiones*

La bibliografía consultada informa de la existencia de técnicas de biología molecular e inmunoenzimáticas (y percibidos entonces como de exactitud superior respecto de métodos bioquímicos) para la determinación de forma directa de microorganismos patógenos en muestras de alimentos.<sup>25,30-31</sup> La adquisición e implementación de tales técnicas en los laboratorios de la red nacional de vigilancia alimentaria del país permitirá no solo una rápida y efectiva determinación de un mayor número de gérmenes patógenos en todo tipo de alimento, sino también un ahorro considerable de recursos, y la modernización tecnológica y analítica de los laboratorios de tal red.

## AGRADECIMIENTOS

Dr. Sergio Santana Porbén, Editor-Ejecutivo de la RCAN Revista Cubana de Alimentación y Nutrición, por sus valiosos aportes durante la edición del presente trabajo.

### SUMMARY

**Rationale:** The increase in the food production in Cuba calls for quick microbiological methods of assay emitting results in the short time possible. **Objective:** To assess the usefulness of the “Food System” kit (Liofilchem, Italy) for the quick microbiological assay of foods in laboratories of the health national network. **Methods:** Operational characteristics of 78 kits used in the assay of 156 food samples were estimated after comparison with existing methods at the Institute of Hygiene, Epidemiology and Microbiology (INHEM) of Havana (Cuba) following ISO 16140-2:2016 guideline [International Standards Organization. Geneva: 2016]. **Results:** Diagnostic strength of the “Food System” kit was uneven and dependent upon the food sample to be assayed and the germ to be detected in a scenario of low microbial contamination. Diagnostic accuracy of the detection of 4 pathogenic species was not different from that expected under randomness. **Conclusions:** The “Food System” kit should be used for detecting pathogenic microorganisms with qualitative criteria in those cases of foods with an important microbial load, assuring always the use of the kit follows guidelines existing in Cuba for the assay of food inocuity. **Recommendations:** To assess the performance of the “Food System” kit in situations of elevated microbial load. **Leyva Castillo V, Puig Peña Y, Ferrer Márquez Y, Hernández Linares A, Aportela López N, Hechavarria Aguinar Z.** Assessment of a fast method for microbiological assay of foods. RCAN Rev Cubana Aliment Nutr 2019;29(2):299-311. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929.

*Subject headings:* Quick diagnosis / Microbiology / Foods / Food safety.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Organización Panamericana de la Salud. Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional. Sistemas alimentarios sostenibles para poner fin al hambre y la malnutrición en América latina y el Caribe. FAO/OPS. Santiago de Chile: 2017. Disponible en: <http://www.fao.org/3/I9553ES/i9553es.pdf>. Fecha de última visita: 5 de Julio del 2018.
2. Fortin ND. The United States FDA Food Safety Modernization Act: The key new requirements. *Eur Food Feed Law Rev* 2011;6:260-8.
3. Wu YN, Chen JS. Food safety monitoring and surveillance in China: Past, present and future. *Food Control* 2018;90:429-39.
4. Comunidad Estados Latinoamericanos y del Caribe. Plan para la Seguridad Alimentaria, Nutrición y Erradicación del Hambre de la CELAC. Resumen Ejecutivo. Quito: 2015. Disponible en: <http://www.plataformacelac.org/es/plan-celac>. Fecha de última visita: 5 de Julio del 2018.
5. Suárez Pita MT, Luna Martínez MV. Registro Sanitario, logros, debilidades y proyecciones al cierre del 2013. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2014;52:143-8.
6. Leyva CV, Pereda LG, Martino ZTK, Aportela LN, Puig PY; *et al.* Implementación del Sistema de Gestión de Calidad en Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Editorial Lazo Adentro. OPS/MINSAP. La Habana: 2013.
7. Leotta, G. Métodos rápidos: Una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos. *Rev Arg Microbiol* 2009;41:63-4. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213016783001.pdf>. Fecha de última visita: 6 de Julio del 2018.
8. Jiménez L. Evaluación de la calidad sanitaria en quesos frescos artesanales mediante métodos rápidos y tradicionales. Tesis para optar por el título de Licenciada en Ciencias de los Alimentos. Ministerio de Educación Superior. Universidad de La Habana. La Habana: 2016.
9. Martino ZTK, Leyva CV, Pérez ChA, de los Reyes M, Suárez F; *et al.* Determinación de *Listeria* spp. en quesos y embutidos comercializados en Cuba. *Rev Cubana Salud Pública* 2005;31:217-22.
10. Pereda LG. Evaluación de un kit TECRA *Salmonella* kits Elisa 3 M. Tesis para optar por un Diplomado en Higiene de los Alimentos. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Ministerio de Salud Pública. La Habana: 2013.
11. System for detection and presumptive identification of pathogenic microorganisms from foodstuffs (FOOD SYSTEM). Liofilchem (Ref. 71680). Rome: 2010. Disponible en: [http://www.liofilchem.net%2Flogin%2Fpd%2Fpi%2F71680\\_PI.pdf](http://www.liofilchem.net%2Flogin%2Fpd%2Fpi%2F71680_PI.pdf). Fecha de última visita: 10 de Octubre del 2018.
12. NC 585 Contaminantes microbiológicos en alimentos- Requisitos sanitarios. Oficina Nacional de Normalización. La Habana: 2017.
13. ISO I. 16140-2: Microbiology of the Food Chain-Method Validation-Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. International Standards Organization. Geneva: 2016.
14. NC-ISO 6579:2002 Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp- Método de referencia. Oficina Nacional de Normalización. La Habana: 2008.

15. ISO 11290-1/1996 Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*-Parte 1: Método de detección. Oficina Nacional de Normalización. La Habana: 2014.
16. ISO 16649-2 Microbiología de alimentación humana y animal. Método horizontal para la enumeración de *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidasa positiva. Parte 2. Oficina Nacional de Normalización. La Habana: 2013.
17. ISO 6888-1:1 Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Método horizontal para la enumeración de *Staphylococcus* coagulasa-positivo (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Parte 1: Técnica utilizando el medio agar Baird Parker. Oficina Nacional de Normalización. La Habana: 2003.
18. Pita Fernández S, Pértegas Díaz S. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. Cad Aten Primaria 2003;10:120-4.
19. Cortés Reyes É, Rubio Romero JA, Gaitán Duarte H. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. Rev Col Obstet Ginecol 2010;61:247-55.
20. Fabricio I, Barreiro E, Santos E, Bajaan E. Detección de *Salmonella* spp. mediante PCR en muestras de embutidos, cereales y superficies inertes. Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. Guayaquil: 2012. Disponible en: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/21709/1/TESIS%20PCR%20IAN-PIERINA.pdf>. Fecha de última visita: 10 de Julio del 2018.
21. Boesche TI, Barros de Freitas J, Fabbi LM, Barioni JW. Comparison of the BAX system PCR method to Brazil's official method for the detection of *Salmonella* in food, water, and environmental Samples. J Food Protect 2008;71:2442-7. Disponible en: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-71.12.2442>. Fecha de última visita: 1 de Julio del 218.
22. Arroyo A, Lissette C, Sierra B, Tatiana J. Comparación de métodos rápidos (*screening Assurance GDS System* y de inmunoensayo VÍA TECRA contra el método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. (ISO 6579: 2002, IDT) en carne de pollo fresca, provenientes de supermercados del área metropolitana. Universidad de El Salvador. El Salvador: 2017. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/12964/1/16103695.pdf>. Fecha de última visita: 10 de Julio del 2018.
23. Sadek S I, Hosny IM, El-Kholy WI, El-Dairouty. Comparative investigations for detection of foodborne microorganisms in Egyptian hard cheese "Ras" using conventional and fast biochemical test. Global Veterinaria 2009;3:189-95. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113109675>. Fecha de última visita: 18 de Julio del 2018.
24. Hosny IM, El Kholy WI, El Dairouty RK, El Shenawy MA, Salah SH. Microbiological quality of different varieties of ready to eat foods retailed in Cairo area. J Am Sci 2011;7:527-36. Disponible en: <http://www.americanscience.org>. Fecha de última visita: 23 de Agosto del 2018.
25. Barrientos EW, Lucas JR, Ramos DD, Rebatta MT, Arbaiza TF. Presencia de *Listeria monocytogenes* en canales porcinos en Lima, Perú. Rev Investig Vet Perú 2015;26(1):135-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10907>. Fecha de última visita: 23 de Agosto del 2018.

26. Martino T, Lemus D, Leyva V, Tejedor R, De los Reyes M, Soto P. Incidencias de *Listeria spp* en hortalizas frescas. Rev Cubana Salud Pública 2008;34:4-10.
27. Aguilar Z. Detección y cuantificación de *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos con el empleo del método cromogénico alternativo. Universidad de La Habana. Ministerio de Educación Superior. La Habana: 2016.
28. Jechorek RP, Johnson RL. Evaluation of the VIDAS staph enterotoxin II (SET 2) immunoassay method for the detection of staphylococcal enterotoxins in selected foods: Collaborative study. J AOAC Int 2008;91:164-73.
29. Broquet I, Inzunza G, Gallegos F. Evaluación del Sistema TEMPO® vs. Normas Oficiales Mexicanas y Petrifilm™ E.coli/Coliformes para la enumeración de bacterias aerobias, coliformes y *E. coli*. en muestras de carnes y productos cárnicos. Métodos Analíticos Detección 2007;401:89-90.
30. Cheung Pui-Yi, Joseph KKM. *Salmonella* in food surveillance: PCR, immunoassays, and other rapid detection and quantification methods. Food Res Int 2012;45:802-8.
31. Martín de Santos R. Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid: 2015. Disponible en: <https://www.analesranf.com/index.php/mo/article/viewFile/1108/1125>. Fecha de última visita: 15 de Julio del 2018.
32. Compact Dry: El método sencillo para la detección de microorganismos. HyServe. Disponible en: <http://www.hyserve.com>. Fecha de última visita: 16 de Julio del 2018.