

ARTICULO DE INVESTIGACIÓN

**VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO DE REFERENCIA PARA LA DETECCIÓN DE  
*SALMONELLA* SPP. EN ALIMENTOS**

**VERIFICATION OF A REFERENCE METHOD FOR THE DETECTION OF *SALMONELLA*  
SPP. IN FOOD**

Marianela Ramón Corría<sup>a,\*</sup> (0000-0002-3846-3436)  
Tamara K. MartinoZagovalov<sup>a</sup> (0009-0000-2171-1942)  
Yamila Puig Peña<sup>a</sup> (0000-0003-2404-123X)  
Virginia Leyva Castillo<sup>a</sup> (0000-0002-3332-6475)  
Yaumara Ferrer Márquez<sup>a</sup> (0000-0001-9197-7877)

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM).

<sup>a,\*</sup> sofita2901@gmail.com

Recibido: 28 de agosto de 2024;

Aceptado: 20 de noviembre de 2024;

**RESUMEN**

Los métodos de ensayo utilizados en los laboratorios para analizar la calidad higiénica sanitaria de los alimentos deben asegurar la fiabilidad de los resultados. Este estudio se realizó con el objetivo de verificar un método de referencia para la detección de *Salmonella* spp. en un laboratorio de Microbiología Sanitaria. Se comprobó que 100 % del equipamiento técnico, medios de cultivo y reactivos utilizados en la verificación cumplieran con los requerimientos de calidad. Para verificar la implementación del método se analizó una muestra de huevo deshidratado. Seguido se efectuó la verificación del producto, en la cual se estudiaron los alimentos siguientes: carne de res cocida, huevo entero, mortadela, leche entera deshidratada, langosta entera, zanahoria, chocolate en polvo y croqueta de picadillo de pollo. En el ensayo se determinaron: la concentración preliminar del cultivo, las concentraciones de los inóculos para cubrir tres niveles de contaminación necesarios en la verificación del método y el límite de detección estimado para 50 % de probabilidad de detección (eLOD50). En la verificación de la implementación, el valor del eLOD50 en el huevo deshidratado fue menor que 5,1 UFC/porción de ensayo y en la verificación de los productos, todos los resultados fueron inferiores a 4 UFC/porción de ensayo, por lo que se cumple con los criterios de aceptación. Así se evidencia la capacidad técnica del laboratorio para ejecutar este método de ensayo.

**Palabras clave:** verificación de métodos, *Salmonella*, límite de detección, alimento.

**ABSTRACT**

The methods used in laboratories to analyze the hygienic and sanitary quality of foods must ensure the reliability of the results. The objective study was verifying the reference method for the detection of *Salmonella* spp., in the laboratory of Microbiology. It was proven that 100 % of the technical equipment, culture media and reagents used in the verification of the method met the quality requirements. To verify the implementation of the method, a sample of dehydrated egg was analyzed and in the verification of the product, the following foods were studied: cooked beef, egg powder, mortadella, dehydrated whole milk, whole lobster, carrot, chocolate powder and minced chicken croquette. In the test, the following were determined: the preliminary concentration of the culture, the concentrations of the inoculums to cover three levels of contamination necessary in the verification of the method and the level of detection at 50 % probability of detection (eLOD50). In the implementation verification, the eLOD50 value in the egg powder was less than 5.1 CFU/test portion and in the verification of the products, all the results were less than 4CFU/test portions, so the acceptance criteria are met. This demonstrates the technical capacity of the Laboratory of Microbiology to execute this analytical method.

**Keywords:** verification of methods, *Salmonella*, level of detection, food.

## INTRODUCCIÓN

En los laboratorios de la cadena alimentaria se requieren altos estándares de calidad para garantizar la confiabilidad de los resultados emitidos. Los laboratorios que emplean métodos de referencia en los ensayos deben planificar y ejecutar la verificación de estos, como parte de las evidencias documentadas para demostrar que los procesos son consistentes dentro de las especificaciones predeterminadas. Estos datos otorgan un valor agregado y, además, permiten efectuar una correcta planificación del control interno de calidad (Camaro Salá, M.L., 2015).

La verificación determina si en el laboratorio se mantienen controladas las variables que intervienen en el proceso de ensayo, lo cual constituye una herramienta útil para asegurar la trazabilidad de cada una y se refleja en los resultados de las pruebas realizadas (Camaro Salá, M.L., 2013). Cuando el laboratorio necesita implementar un método de referencia nuevo o algún cambio publicado como resultado de la actualización del que se emplea en la rutina, se debe elaborar un protocolo de verificación con los detalles de las actividades a ejecutar, de modo que el laboratorio asegure llevarlo a cabo correctamente. La verificación de los métodos microbiológicos de referencia cualitativos, de acuerdo con la norma ISO 16140-3 (ISO 16140-3, 2021) implica la estimación del límite de detección para 50 % de probabilidad de detección (LOD50), en los productos de las categorías de interés. Hasta que culmine su período de implementación en diciembre de 2027, esta norma permitirá realizar las actividades de verificación sobre la base de dos principios: 1) dentro del alcance de la validación y 2) dentro del alcance de aplicación del laboratorio para los métodos que no están (completamente) validados. Este trabajo se realizó con el objetivo de verificar el método de referencia UNE-EN ISO 6579-1 (UNE-EN ISO 6579-1, 2021) de detección de *Salmonella* spp. en alimentos de consumo humano, como parte de la mejora continua dentro del Sistema de Gestión de la Calidad (SGC) del Laboratorio de Microbiología Sanitaria del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM).

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el Laboratorio de Microbiología Sanitaria del INHEM, entre 2021 y 2023, se realizó un estudio analítico experimental para verificar el método de detección de *Salmonella* spp. en alimentos de consumo humano, descrito en la norma UNE-EN ISO 6579-1. Para la elaboración de los protocolos de verificación se utilizó, entre los Documentos del Sistema de Calidad del laboratorio de Microbiología Sanitaria (DSC.MS.), el procedimiento basado en la metodología descrita en la norma ISO 16140-3.

### Comprobaciones previas

Se revisó el cumplimiento de los requisitos de las normas NC ISO 17025, ISO 7218, NCISO 11133 (ISO/IEC 17025, 2017; ISO 7218, 2013; NC ISO 11133, 2021) y de los documentos del Órgano Nacional de Acreditación DD4 A y POL3 (DD4, 2019; POL3, 2013) respecto al personal, las instalaciones y los suministros, así como los vinculados al aseguramiento de la validez de los resultados del equipamiento, medios de cultivo, soluciones, reactivos y cepas de microorganismos a emplear. Los datos se obtuvieron de los documentos del SGC del laboratorio.

### Análisis de los alcances

Se correlacionaron los grupos de alimentos establecidos en la norma cubana NC 585 (NC 585, 2015 de criterios microbiológicos a los cuales se indica la determinación de *Salmonella* spp. con las categorías de productos del anexo A de la norma ISO 16140-3 que abarcan los alcances del método, de la validación y de aplicación del laboratorio. Se identificaron las categorías de productos (alimentos) involucradas en cada alcance.

### Identificación del tipo de verificación a realizar y selección de los productos(alimentos)

Se realizó la verificación bajo el alcance de la validación en alimentos que se analizan rutinariamente en el laboratorio. El estudio se hizo en dos etapas, comenzó con la verificación de la implementación en un alimento probado en la validación y continuó con la verificación del producto en dos alimentos de matrices desafiantes, los cuales se identificaron en categorías dentro del alcance de la validación.

Además, se efectuó la verificación dentro del alcance de aplicación del laboratorio en siete alimentos de diferentes categorías fuera del alcance de la validación. En la selección se tuvo en cuenta el porcentaje de muestras analizadas y de detección de *Salmonella* spp. por grupo de alimento con respecto al total de muestras analizadas en el laboratorio entre 2017 y 2022.

La verificación del producto se realizó en un alimento con una matriz no desafiante, y luego, de manera paulatina, en los alimentos desafiantes; este protocolo se corresponde con el anexo F de la norma ISO 16140-3. En el cuadro 1 se relacionan los productos seleccionados para la verificación del método con las categorías de la norma ISO 16140-3 y los grupos de la NC 585, de acuerdo con el principio seguido en la verificación.

**Cuadro 1. Productos usados en la verificación del método de referencia de detección de *Salmonella* spp**

<i>Alcance de la verificación</i>	<i>Tipo de verificación</i>	<i>Grupo (NC 585)</i>	<i>Categoría (ISO 16140-3)</i>	<i>Alimentos</i>
Dentro de la validación del método	Verificación de la implementación	9 Huevos y derivados	Huevo y productos (derivados) de huevo	Huevo deshidratado
		9 Huevos y derivados	Huevo y productos (derivados) de huevo	Huevo entero
	Verificación del producto	1 Leche y productos lácteos	Leche cruda y productos lácteos	Queso fresco
Dentro de la aplicación del laboratorio	Verificación del producto	13 Alimentos listos para el consumo	Productos cárnicos listos para comer, listos para recalentar	Carne de res cocida
		2 Carnes y productos cárnicos		Mortadela
		1 Leche y productos lácteos	Leche y productos lácteos sometidos a tratamiento térmico	Leche entera deshidratada
		3 Pescados, mariscos y productos de la pesca	Pescados y mariscos crudos y listos para cocinar (sin procesar)	Langosta entera
		12 Frutas, verduras y hortalizas	Productos frescos y frutas	Zanahoria
		7 Derivados del cacao	Chocolate, productos de panadería y pastelería	Chocolate en polvo
		2 Carnes y productos cárnicos	Alimentos de múltiples componentes o componentes de comida	Croquetas de picadillo de pollo

Las muestras se tomaron de las que recibe el laboratorio, se conservaron bajo las condiciones establecidas por el productor y no se sometieron a ningún tratamiento previo a su análisis.

Las características de cada alimento se obtuvieron de las fichas técnicas del Departamento de Calidad y Registro Sanitario del Ministerio de Salud Pública y de los registros de resultados de los DSC.MS. Previo al estudio, se comprobó la ausencia de *Salmonella* spp. en todas las muestras utilizadas.

### Selección de las cepas

En la contaminación artificial de los alimentos se usaron las cepas del banco de trabajo del cepario del Laboratorio de Control de la Calidad del INHEM, que se relacionan en el cuadro 2. En los registros de las cepas se comprobaron los controles de calidad realizados.

**Cuadro 2.** Cepas seleccionadas para la contaminación de los alimentos

<i>Alimentos</i>	<i>Cepa usada en la contaminación</i>	<i>Origen de la cepa</i>
Huevo deshidratado Queso fresco Carne cocida Mortadela Zanahoria	<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028
Huevo entero Langosta entera Leche entera deshidratada Chocolate en polvo	<i>Salmonella</i> Enteritidis	CECT 4300
Croquetas de picadillo de pollo	<i>Salmonella</i> Amsterdam	Aislamiento del laboratorio en hamburguesa mixta

### Preparación de los inóculos

Se obtuvieron cultivos de las cepas en fase estacionaria, tomando una asada de cuñas frescas, la cual se inoculó en 10 ml de Caldo triptona soya e incubó a 37 °C durante 18 horas. Luego, los microorganismos se cuantificaron mediante conteo en placas de Agar nutriente, por duplicado. Se realizaron diluciones de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-9</sup> de cada cultivo y se sembraron en Agar nutriente. De acuerdo con la norma ISO 7218, se contaron las colonias en las placas que contenían entre 10 y 300, a las 24 horas, 37 °C y se calculó la concentración microbiana en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL).

El resultado de la enumeración se utilizó como punto de partida para las diluciones a inocular en las porciones de ensayo, de modo que se lograran los tres niveles de contaminación requeridos. En cada verificación se preparó un nuevo cultivo del microorganismo, bajo iguales condiciones y se comprobó la concentración alcanzada en el inóculo alto utilizado para la contaminación.

Selección del diseño experimental

Se aplicó el protocolo 1 de la norma ISO 16140-3.

Preparación y contaminación de las porciones de ensayo

Las porciones de ensayo se prepararon de acuerdo con la norma ISO 6887-1 (ISO 6887-1, 2002). Los huevos enteros se sumergieron en etanol 70 % por 30 minutos y se cascaron en condiciones de asepsia justo antes de preparar las porciones de ensayo.

Por cada muestra de alimento se prepararon once porciones de ensayo de 25 g y se suspendieron en 225 ml de Agua peptonada buferada. A diez de las porciones se les adicionó 1 ml de las diluciones correspondientes escogidas del cultivo de la manera siguiente: una porción de ensayo con el nivel alto, cuatro con el nivel intermedio y cuatro con el nivel bajo, se preparó una dilución extra para el nivel más bajo; una porción de ensayo se dejó sin inocular (control blanco). Una vez que se adquirió experiencia en el proceder se eliminó el nivel de contaminación preparado con la dilución extra.

Luego, las bolsas se mezclaron en homogeneizador peristáltico por 30 segundos para asegurar una suspensión uniforme de la muestra.

### Selección de los niveles de contaminación

El nivel de inoculación alto se comprobó mediante siembra por la técnica de placa vertida. La concentración del microorganismo inoculado (UFC/ml) en las otras diluciones retenidas se calculó a partir de los datos obtenidos para el nivel alto. En la verificación el nivel bajo se seleccionó en la dilución que tuvo el valor más próximo al informado en el estudio de validación y más cercano a 1 UFC/porción de ensayo, en correspondencia con el alcance de la verificación.

### Determinación del LOD50 estimado (eLOD50)

Todas las porciones se sometieron a ensayo según el protocolo descrito en la norma UNE-EN ISO 6579-1. De las porciones de cada nivel se escogió una placa con colonias puras, bien aisladas para realizar las pruebas de confirmación.

En cada alimento verificado se anotó el número de resultados positivos de cada uno de los tres niveles de contaminación seleccionados. El resultado del nivel más bajo de contaminación se multiplicó por el valor que ofrece la combinación de resultados positivos en la tabla 6 de la norma ISO 16140-3. Los resultados se consideraron válidos siempre que el control blanco dio un resultado negativo y el protocolo funcionó para las porciones contaminadas.

### Evaluación de los resultados

El criterio de aceptación en la verificación de la implementación se cumplió cuando:  $eLOD50 \leq 4xLOD50$  en la validación. En la verificación del producto, el límite de aceptabilidad se basa en el valor teórico de LOD50 igual a 1 UFC/mL, este se cumplió cuando  $eLOD50 \leq 4UFC$ /porción de ensayo.

### RESULTADOS

En la revisión documental de las fichas técnicas de equipos e instrumentos de medición, incluyendo los certificados de calibración emitidos por entidades competentes, se comprobó que se cumplían los requerimientos técnicos y de calidad para realizar las verificaciones. Asimismo, en los registros del control de calidad de los medios de cultivo, soluciones y reactivos los resultados fueron satisfactorios.

Las cepas de cultivos de colección están avaladas por sus certificados y controladas en el laboratorio. En la cepa aislada de una muestra de laboratorio (hamburguesa mixta) se detectó el gen *InvA* de *Salmonella* spp. mediante PCR (Malorny, B., 2003) y fue identificada como *S. Amsterdam*.

El laboratorio cuenta con el permiso de seguridad biológica; se controlan las condiciones ambientales de las instalaciones en las cuales se efectúan las actividades y el uso del equipamiento fundamental; el personal está autorizado a realizar las verificaciones en función de la capacitación y la experiencia.

El alcance del método de detección de *Salmonella* spp. ISO 6579-1 se consideró de amplia gama de alimentos y otras categorías, incluye todas las categorías descritas en el Anexo A de la norma ISO 16140-3. Por otra parte, en la validación se identificaron productos de cuatro categorías: tres de alimentos pertenecientes a las categorías 1) Leche cruda y productos lácteos, 2) Huevo y productos derivados de huevo y 3) Aves de corral crudas y productos de aves de corral listos para cocinar; además, otra categoría correspondiente a 1) Muestras de la producción primaria; por lo cual este alcance se clasificó de gama limitada de alimentos y otras categorías.

Se comprobó que el laboratorio tiene un alcance de aplicación de amplia gama de alimentos más otras categorías, se analizan trece categorías de alimentos y las muestras del ambiente en el área de producción y manipulación de alimentos; la determinación de *Salmonella* spp. se realiza en todas las categorías de alimentos, excepto en las dos que incluyen las carnes crudas. Este trabajo brinda los resultados de ocho categorías de alimentos.

En la verificación dentro del alcance de la validación, el alimento escogido para realizar la verificación de la implementación fue el huevo deshidratado, único producto estudiado en la validación que también es analizado en el laboratorio; para la verificación de los productos se seleccionó el huevo entero y el queso fresco. Las características desafiantes de las matrices de estos alimentos que pueden afectar el método a verificar, consideradas en este estudio se indican en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Características de los alimentos seleccionados que pueden afectar el desempeño del método que se verifica

Alimento	Microorganismos competitivos		Características físicas		Componentes químicos	
	Elevada microbiota acompañante	pH	Actividad acuosa	Solubilidad/viscosidad	Sales, aditivos	Polifenoles
Huevo entero		x		x		
Queso fresco	x			x		
Mortadela				x	x	
Leche entera deshidratada			x	x		
Langosta entera	x					

Zanahoria	x		x	
Chocolate en polvo		x		x
Croquetas de picadillo de pollo	x		x	

*Adaptado de ISO 16140-3:2021.*

En el análisis de la detección de *Salmonella* spp. por grupo de alimentos en el laboratorio, que se presenta en la tabla 1, el mayor porcentaje de muestras trabajadas, 49,9 %, y la mayor frecuencia de aislamientos (4,6 %) se obtuvo en los productos cárnicos. Dentro de este grupo se seleccionó una carne cocida como alimento no desafiante, por presentar una matriz rica en nutrientes, magra y que homogeneizó de forma efectiva. Con características desafiantes se escogieron otros seis alimentos. El cuadro 3 resume los efectos de las matrices considerados en la selección; para cada alimento se tuvo en cuenta, en general, al menos dos características desafiantes.

**Tabla 1.** Muestras analizadas por tipo de alimentos y detección de *Salmonella* spp. INHEM, 2017-2022

Grupo de alimentos	Determinación de <i>Salmonella</i> spp.			
	Total de muestras	% <sup>a</sup>	Muestras positivas	% <sup>b</sup>
Productos cárnicos (excepto crudos)	2096	49,9	96	4,6
Productos lácteos	586	13,9	0	0,0
Pescados y mariscos	1342	31,9	29	2,2
Frutas y vegetales	66	1,6	2	3,0
Otros alimentos	113	2,7	6	5,3
Total (%)	4203	100,0	133	3,2

*Leyenda: a: porcentaje en base al total de muestras analizadas, b: porcentaje en base al número de muestras por grupo de alimentos.*

En la tabla 2 se muestra el recuento preliminar de los cultivos de 18 horas de las cepas usadas en este estudio, el cual se tomó como referente para la contaminación artificial de las muestras, tanto en la verificación de la implementación como en la verificación del producto.

**Tabla 2.** Recuentos preliminares de los cultivos de *Salmonella* spp. según la dilución

Cepas	Réplica	Recuentos (UFC/placa en cada dilución)			Concentración (UFC/mL)
		10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	
S. Typhimurium ATCC 14028	1	> 300	163	17	1,7·10 <sup>9</sup>
	2	> 300	160	27	
	<i>Valor medio</i>		161,5	22	
S. Enteritidis CECT 4300	1	> 300	175	19	1,9·10 <sup>9</sup>
	2	> 300	190	27	
	<i>Valor medio</i>		182,5	23	
S. Amsterdam	1	> 300	168	21	1,8·10 <sup>9</sup>
	2	> 300	175	27	
	<i>Valor medio</i>		171,5	24	

El nivel bajo retenido en todos los alimentos estudiados fue el inoculado con la dilución D, los niveles obtenidos en las diluciones B y C se escogieron como nivel alto e intermedio, respectivamente (tablas 4 y 5).

**Tabla 3.** Concentración de *S. Typhimurium* esperada en las diluciones preparadas para obtener los tres niveles de contaminación requeridos en la verificación

Denominación	Verificación de la implementación		Verificación del producto	
	Preparación de la dilución	Concentración (UFC/mL)	Preparación de la dilución	Concentración (UFC/mL)
Dilución A	Dilución 10 <sup>-7</sup> del cultivo preparado	161,5	Dilución 10 <sup>-8</sup> del cultivo preparado	22
Dilución B	Dilución 1:3 de A	53,8	Dilución 1:3 de A	7,3
Dilución C	Dilución 1:3 de B	17,9	Dilución 1:3 de B	2,4
Dilución D	Dilución 1:3 de C	5,9	Dilución 1:3 de C	0,8
Dilución E	Dilución 1:3 de D	1,9	Dilución 1:3 de D	0,3

El nivel bajo retenido en todos los alimentos estudiados fue el inoculado con la dilución D, los niveles obtenidos en las diluciones B y C se escogieron como nivel alto e intermedio, respectivamente (tablas 4 y 5).

**Tabla 4.** Concentración de *Salmonella* Typhimurium en las diluciones usadas para la contaminación artificial en la verificación de la implementación

Alimento	Recuento real (UFC/mL del inóculo)		Calculado del inóculo alto (UFC/mL del inóculo)		
	Diluciones				
	A	B	C	D	E
Huevo deshidratado	152,0	46,0	15,3	<b>5,1</b>	1,7

**Tabla 5.** Concentración de *Salmonella* Typhimurium en las diluciones usadas para la contaminación artificial en las verificaciones de los productos

Alimentos	Recuento real (UFC/mL del inóculo)		Calculado del inóculo alto (UFC/mL del inóculo)		
	Diluciones				
	A	B	C	D	E
Huevo entero	24,0	8,0	2,6	<b>0,9</b>	
Queso fresco	27,0	9,0	3,0	<b>0,9</b>	
Carne de res cocida	19,0	6,0	2,0	<b>0,7</b>	
Mortadela	21,5	7,2	2,4	<b>0,8</b>	
Leche entera deshidratada	20,0	6,7	2,2	<b>0,7</b>	
Langosta entera	22,5	7,5	2,5	<b>0,8</b>	
Zanahoria	27,0	9,0	3,0	<b>1,0</b>	
Chocolate	21,0	7,0	2,3	<b>0,8</b>	
Croquetas de picadillo de pollo	20,0	6,7	2,2	<b>0,7</b>	

En la comprobación de los inóculos, los recuentos de las diluciones A se muestran en las tablas 4 y 5, además de los valores reales calculados para los niveles de contaminación intermedio y bajo, de las diluciones C y D, respectivamente.

De los niveles de contaminación alto, intermedio y bajo se obtuvieron colonias aisladas en las placas de Agar xilosa lisina desoxicolato (Agar XLD) y de Agar *Salmonella Shigella* (Agar SS) que mostraron el crecimiento típico de la cepa inoculada. En cada nivel estudiado se obtuvo un comportamiento bioquímico acorde al descrito para este género microbiano y la prueba serológica confirmó la presencia de la cepa utilizada.

Los resultados positivos de los tres niveles de contaminación retenidos en cada alimento y el nivel blanco aparecen en la tabla 7, los cuales fueron válidos para la estimación del LOD50 (eLOD50) en los alimentos verificados.

**Tabla 7.** Determinación del eLOD<sub>50</sub> basado en el número de resultados positivos por nivel de contaminación

Alimentos	Número de resultados positivos/Número de réplica(s)				eLOD <sub>50</sub> UFC/porción de ensayo
	Nivel de inóculo			Control (Blanco)	
	Alto	Intermedio	Bajo		
Huevo deshidratado	1/1	4/4	4/4	0/1	< 5,1
Huevo entero	1/1	4/4	4/4	0/1	<0,9
Queso fresco	1/1	4/4	4/4	0/1	<0,9
Carne de res cocida	1/1	4/4	4/4	0/1	<0,7
Mortadela	1/1	4/4	4/4	0/1	<0,8
Leche entera deshidratada	1/1	4/4	3/4	0/1	0,3
Langosta entera	1/1	4/4	4/4	0/1	< 0,8
Zanahoria	1/1	4/4	4/4	0/1	< 1,0
Chocolate	1/1	4/4	3/4	0/1	0,4
Croquetas de picadillo de pollo	1/1	4/4	3/4	0/1	0,3

En la verificación de la implementación, el valor del eLOD<sub>50</sub> en huevo deshidratado fue inferior a 24, cuádruplo del LOD<sub>50</sub> informado para este alimento en la validación; en la verificación de los productos, todos los resultados fueron inferiores a 4 UFC/porción de ensayo, en consecuencia, los resultados cumplen con los criterios de aceptación.

## DISCUSIÓN

Antes de comenzar la verificación del método de detección de *Salmonella* spp. es importante que el laboratorio disponga de un sistema de gestión de la calidad que se corresponda con los requisitos normativos de la ISO/IEC 17025 (ISO/IEC 17025, 2017). El laboratorio de microbiología del INHEM posee un programa de control de calidad y tiene establecidas las actividades necesarias para minimizar los errores resultantes de las variaciones en el personal, los equipos e instrumentos, los suministros, los reactivos, el análisis, y el manejo y presentación de los datos.

Los equipos e instrumentos usados deben ser exactos y la incertidumbre de la medición no debe afectar la obtención de resultados válidos, asimismo se debe cumplir con la trazabilidad metrológica (Robert Pullés, M., 2016; Betancourt Bravo, A., 2019). En la documentación de calidad del Laboratorio de Microbiología del INHEM, se recogen los certificados de calibración actualizados, las instrucciones de uso y el registro del mantenimiento planificado de equipos e instrumentos, con lo cual se aseguró el funcionamiento apropiado de estos.

Los lotes de medios de cultivo y reactivos utilizados en la verificación resultaron aceptables en la prueba de esterilidad, el control de pH, las características físicas (homogeneidad, textura, color, llenado e inclinación) y las pruebas de desempeño. La comprobación de calidad de los medios de cultivo cumplió con los parámetros planteados en la norma ISO 11133.

Todos los ensayos fueron ejecutados en las instalaciones del laboratorio, las cuales facilitan el flujo de actividades de manera segura y poseen una infraestructura que cumple con los requisitos de temperatura y ventilación. Los protocolos de control ambiental, tales como limpieza y desinfección, monitoreo del nivel de contaminación de superficies de mesetas y gabinetes de seguridad biológica, garantizaron las condiciones ambientales para la ejecución de los ensayos, lograr la calidad de la medición y la protección del personal.

Una etapa clave antes de la verificación es la preparación del inóculo para la contaminación artificial de las porciones de ensayo. Se consideró lo indicado en la norma ISO 16140-3, se usaron dos cepas de colecciones reconocidas: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 y *S. Enteritidis* CECT 4300, y una cepa de colección propia del laboratorio, *S. Amsterdam*, relevante para el alimento que se estudió. Las cepas cumplieron con los controles establecidos en ISO 11133. Algunos de los parámetros del desempeño del método de detección pueden estar influenciados por el tipo de cepa. Por ejemplo, en un estudio realizado por Nauta *et al.*, para estimar el límite de detección en medios cromogénicos mediante *Rapid'* Método *Salmonella*, se emplearon cepas de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y otros serotipos de *Salmonella* spp. en carne de ave (Nauta, T.M., 2020; Cajas Ríos, O.C., 2021).

Otro aspecto a considerar en la verificación del método microbiológico es seleccionar tipos de alimentos que se analizan de manera rutinaria en el laboratorio porque se desea demostrar que, en las condiciones reales de análisis,

los resultados emitidos son correctos y, por lo tanto, no tiene ningún sentido emplear matrices que no reflejen la realidad (González Márquez, M.R., 2005). Así, el número de alimentos que se necesitan para realizar la verificación del método de detección de *Salmonella* depende del número de categorías para las que el laboratorio utilice este método. En el Laboratorio de Microbiología del INHEM se analizan alimentos comercializados en Cuba, ya sean de producción nacional o importación, los cuales se incluyen en trece categorías, además de otras categorías (no alimentarias). Es por eso que se consideró la frecuencia de análisis de la detección de *Salmonella* spp. por grupo de alimentos. El presente estudio se realizó solo en siete categorías, debido al costo y el tiempo que implica la ejecución de los ensayos de verificación. Para completar la verificación se recomienda analizar los productos del resto de las categorías de alimentos y otras categorías de interés, de manera paulatina.

Se utilizaron matrices con un pH alto, una baja actividad de agua, una gran cantidad de partículas o cualquier otra característica que pudiera ser inhibitoria o resultara desafiante para el desempeño del método, de manera que se pudiera asegurar, ante resultados satisfactorios, que el método resulta apto para el propósito, en el tipo de alimento de interés.

En el estudio de validación del método de detección de *Salmonella* spp., UNE-ISO 6579-1 se probaron tres tipos de alimentos de tres categorías diferentes: cuajada de queso fresco, huevo en polvo deshidratado y carne cruda de pollo, además de otras categorías incluidas dentro del alcance del método analítico: heces de animales y muestras ambientales en la etapa de producción primaria. En la actualidad son varios los métodos de referencia que no han sido validados por completo, la norma ISO 16140-3, en implementación, tiene un protocolo específico (Anexo F) para la verificación de los alimentos no incluidos en el alcance de la validación que son de interés del laboratorio.

En la primera etapa se utiliza un alimento probado en el estudio de validación para establecer la comparación entre las características del desempeño del método, ya que en la determinación del eLOD50 influye el tipo de matriz. Por esta razón, se escogió el huevo deshidratado, único alimento analizado en la rutina del laboratorio entre los tres evaluados en la validación del método.

Sin embargo, en ocasiones resulta difícil la selección de los alimentos, por ejemplo, no se aclara en UNE-EN ISO 6579-1 si la cuajada de queso está elaborada con leche cruda o pasteurizada. Inicialmente, la categoría leche cruda, ni carne de ave cruda eran de interés del laboratorio, por lo que se asumió que un solo alimento de los usados en la validación, la categoría Huevos y derivados, estaba en el alcance de aplicación del laboratorio; más adelante se incluyeron los lácteos crudos. Por esa razón se escogió entre los alimentos desafiantes el huevo entero y, posteriormente, un queso fresco elaborado con leche cruda.

A modo de ejemplo, el desafío de estas matrices estuvo dado por el pH básico, alrededor de 10,8 (Corry, J.E.L., 2011) y la viscosidad asociada al contenido de albúmina y mucoproteínas en el huevo entero, y en el queso fresco, por el contenido de grasa (mayor del 30 %) y la carga microbiana de microorganismos coliformes que superó los límites permisibles (mayor de  $10^2$  UFC/g), de acuerdo con la ficha técnica del producto y los registros de resultados del laboratorio.

Es preciso destacar que la presencia de *Salmonella* spp. en productos cárnicos elaborados es bajo a nivel internacional, pero en el contexto nacional existe el riesgo de recontaminación después del procesamiento, el cual se ha valorado en más del 25 %, relacionado con factores como la contaminación cruzada. En la literatura revisada los expertos reconocen factores humanos como posibles puntos críticos que contribuyen a la presencia del patógeno en este grupo de alimentos, con relación a la forma en que los alimentos se procesan, transportan y almacenan, debido a que estos tienen una fuerte influencia sobre la carga microbiana en productos alimenticios específicos (Puig Peña, Y., 2011; Lechner, I., 2020).

A diferencia de las matrices identificadas en este estudio, en las validaciones y verificaciones a nivel internacional generalmente se emplean las carnes crudas, las cuales suelen estar muy contaminadas; se ha observado un elevado número de microorganismos presentes en la matriz que puede interferir en el aislamiento y detección del microorganismo objeto de estudio en el proceso de verificación del método de ensayo. En esta investigación, no se tuvo en cuenta este tipo de muestras porque en la norma de criterios microbiológicos en Cuba no está establecido la detección de *Salmonella* spp. en carnes crudas (NC 585, 2015).

Se escogió una carne magra cocida con una carga microbiana baja según los resultados del laboratorio (inferior a  $10^2$  UFC de microorganismos a 30 °C/ g), como alimento no desafiante y además una mortadela. La ficha técnica de este último producto, declarada por el cliente, recogió una composición de 1,0 a 3,0 ppm de concentración de cloruro de sodio, 125 ppm de concentración de nitrito y 27 % de grasas, el laboratorio obtuvo  $1,310^3$  UFC de microorganismos a 30 °C/ g, lo cual representó una carga microbiana por encima de los límites de aceptabilidad.

Los parámetros a verificar en un método cualitativo son las características que lo hacen apto para un uso previsto. El diseño experimental utilizado en esta investigación, permitió determinar el número más bajo de microorganismos cultivables presentes en una muestra para poder obtener un resultado positivo con una probabilidad del 50 % (LOD50).

En la verificación de la implementación se tomó el valor del LOD50 del estudio de validación, (intervalo de confianza de 95 %) de 6,0 (entre 4,7 y 7,7) UFC/porción de ensayo del huevo deshidratado, como referente para calcular los niveles de contaminación necesarios: nivel alto (máximo nueve veces el LOD50 esperado), nivel intermedio (tres veces el LOD50 esperado) y nivel bajo (una vez el LOD50 esperado).

En las verificaciones de los productos se asumió como referente un valor de 1 UFC/porción de ensayo. Se seleccionó la dilución correspondiente del inóculo y se realizaron diluciones con un factor de 1:3, hasta cubrir los tres niveles de contaminación.

El límite de detección estuvo en correspondencia con el inóculo empleado y se obtuvieron valores menores que cumplieron con los criterios de aceptabilidad. De acuerdo con la norma ISO 16140-3, el método cualitativo verificado es aceptable.

El diseño experimental utilizado en este estudio puede ser considerado factible de acuerdo con las normativas vigentes. Además, es necesario para la actualización de los procesos de acreditación, en cumplimiento con la norma ISO/IEC 17025. Por lo tanto, es posible ampliar el estudio a otras matrices al contar con una metodología para realizar la verificación, sobre todo para los laboratorios que poseen un alcance de aplicación para una amplia gama de alimentos.

Con la verificación del método, el Laboratorio de Microbiología Sanitaria del INHEM demostró que es capaz de obtener resultados confiables y seguros. La evidencia del proceso de análisis y que este resulte eficiente es importante porque sus resultados permiten tomar decisiones relacionadas con la salud de las personas, además de todas las repercusiones económicas que puede significar para el país.

## CONCLUSIONES

Se implementó la norma ISO 16140-3 en la verificación del método cualitativo de referencia UNE-EN ISO 6579-1 para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos. Los valores estimados del límite de detección para 50 % de probabilidad de detección (eLOD50) en las matrices estudiadas cumplieron con el criterio de aceptabilidad. Los resultados del estudio constituyen una evidencia de la eficiencia del proceso analítico y se demuestra que el laboratorio brinda resultados confiables y seguros, lo cual posibilita tomar decisiones para la comercialización segura de los productos y de esta manera evitar enfermedades transmitidas por los alimentos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Camaro Salá ML, Martínez García R, Olmos Martínez P, Catalá Cuenca V, Ocete Mochon MD, Gimeno Cardona C. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. [Internet]. 2015 [citado 2019], 33(7): 31-36. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosasmicrobiologia-clinica-28-pdf-S0213005X13003911>
- Camaro Salá ML, Catalá Cuenca V, Gimeno Cardona C, Martínez García R, Olmos Martínez P. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. [Internet]. EIMC; 2013. [citado 2018]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia48.pdf>
- ISO 16140-3:2021. Microbiology of the food chain-Method validation- Part 3: Protocol for verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. [Internet]; 2021. [citado 2021]. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/66324.html>
- UNE-EN ISO 6579-1. (2021). Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*. Parte 1: Detección de *Salmonella* spp. Modificación 1: Ampliación del rango de temperaturas de incubación, modificación del estado del Anexo D y corrección de la composición de los medios MSR/V y SC. (ISO 6579-1:2017/A 1:2020).
- ISO/IEC 17025:2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. [Internet]. Online Browsing Platform; 2017. [citado 2019]. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v2:es>

- ISO 7218. Microbiology of the food chain. General requirements and guidance for microbiological examinations [Internet].ISO; 2007/ADM 2013. Disponible en:<https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?Tipo=N&c=N0040646>
- NC ISO 11133. (2021). Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal; y del agua —Preparación, producción, almacenamiento y pruebas de desempeño de medios de cultivo. (ISO 11133:2014/Amd.1:2018,(E)/Amd.2:2020 (K)). ONARC.(2013) Política sobre la trazabilidad de las mediciones. [Internet]. DocPlayer.es [citado2023]. Disponible en:<https://docplayer.es/13872336-Onarc-pol-2-politica-sobre-latrabilidad-de-las-mediciones-2013-rev-03.html>
- DD4A. Anexo A Criterios para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Órgano Nacional de acreditación de la República de Cuba (ONARC), 2019.
- POL 3. Política de trazabilidad de las mediciones. Órgano Nacional de acreditación de la República de Cuba (ONARC), 2023.
- NC 585. Contaminantes microbiológicos en alimentos- Requisitos sanitarios. [Internet]. Oficina Nacional de Normalización (NC); 2015. [citado enero 2015]. Disponible en: <http://ftp.isdi.co.cu>
- ISO 6887-1:2002. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Preparación de la muestra de ensayo, la suspensión inicial y las diluciones decimales para pruebas microbiológicas. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales. (ISO 6887-1: 1999, IDT), Disponible en: Oficina Nacional de Acreditación.
- Malorny B, Hoofar J, Bunge C *et al.* Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR towards an International Standard, Applied and Environmental Microbiolgy, 2003, 69(1): 290-296.
- Robert Pullés M., Mayarí Navarro R. y Martínez Morales V. Criterios para la acreditación de laboratorios que realizan ensayos microbiológicos según NC ISO/IEC17025. Rev. CENIC Ciencias Biológicas [Internet], 2006, 37(1). Disponible en:<https://revista.cnic.edu.cu/index.php/RevBiol/article/download/1122/877/225>
- Betancourt Bravo A. Evolución del sistema de gestión de la calidad en los laboratorios de ensayo. Rev Salud Anim. [Internet]. vol.41 no.2 La Habana, 2019 [citado 01-Ago-2019] ISSN 0253-570Xversión On-line ISSN 2224-4700 Disponible en:[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2019000200009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2019000200009)
- Nauta TM, Al-Sabi MN, A-lli WQ y Vigre H. The “Rapid’*Salmonella*” Method: Estimation of the Limit of Detection for *Salmonella* Strains Typhimurium and Enteritidis Isolated from Frozen Poultry Meat. [Internet]. Modern Applied Science, 2020. 14(12),43-51. Disponible en: <https://doi.org/10.5539/mas.v14n12p43>
- Cajas Ríos, OC. Verificación del método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. basado en la ISO 6579 y del método horizontal para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C basado en la ISO 4833, en alimentos en el Laboratoriode Microbiología de Agrocalidad, Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura, Quito, Ecuador, 2012-2013. [Tesis] [Internet]. Universidad de las Fuerzas Armadas; 2021. [citado]. Disponible en:<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/26205/1/T-ESPE-046537.pdf>
- González Márquez MR. Guía para la evaluación de métodos microbiológicos, Disponible en: [https://gqspcolombia.org/wpcontent/uploads/2023/11/Guia\\_microbiologia\\_INM.pdf](https://gqspcolombia.org/wpcontent/uploads/2023/11/Guia_microbiologia_INM.pdf)
- Delgado G. Validación y verificación de métodos de ensayos. Un dilema en los laboratorios de ensayos y en las auditorías de la acreditación. Universitas [Internet].2005[citado 2019]; 3(2):14-21. Disponible en:[https://www.academia.edu/28948875/Validaci%C3%B3n\\_y\\_verificaci%C3%B3n\\_de\\_m%C3%A9todos\\_de\\_ensayos\\_Un\\_dilema\\_en\\_los\\_laboratorios\\_de\\_ensayos\\_y\\_en\\_las\\_auditor%C3%ADas\\_de\\_la\\_acreditaci%C3%B3n](https://www.academia.edu/28948875/Validaci%C3%B3n_y_verificaci%C3%B3n_de_m%C3%A9todos_de_ensayos_Un_dilema_en_los_laboratorios_de_ensayos_y_en_las_auditor%C3%ADas_de_la_acreditaci%C3%B3n)
- Corry JEL. Capítulo 9 Análisis microbiológico de huevos y ovoproductos, en: Análisis Microbiológico de Carnes Rojas, Aves y Huevo. Editor G.C. Mead, Editorial Acribia, Zaragoza, España. 2009 p.181-198.
- Puig Peña Y, Espino Hernández M, Leyva Castillo V, Aportela López N, Machín Díaz M, Soto Rodríguez P. Serovariedades y patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de *Salmonella* aisladas de alimentos en Cuba. Rev Panam Salud Pública [Internet]. 2011 [citado];30(6). Disponible en:<https://scielosp.org/pdf/rpsp/2011.v30n6/561-565/es>
- Lechner I, Freivogel C, Stärk KDC and Visschers VHM. Exposure Pathways to Antimicrobial Resistance at the Human-Animal Interface. A Qualitative Comparison of Swiss Expert and Consumer Opinions. Front. Public Health 8:345.[Internet] doi:10.3389/fpubh.2020.00345

### CONTRIBUCCION AUTORAL

**Marianela Ramón Corría:** Conceptualización, Adquisición de fondos, Administración del proyecto, Análisis formal, Investigación, Metodología, Supervisión, redacción – borrador original, Escritura – revisión y edición, Visualización.

**Tamara K Martino Zagovalov:** Curación de datos, Análisis formal, Investigación, Metodología, Escritura – revisión y edición, Visualización

**Yamila Puig Peña:** Curación de datos, Análisis formal, Investigación, Metodología, Escritura – revisión y edición, Visualización

**Virginia Leyva Castillo:** Curación de datos, Análisis formal, Metodología, Visualización

**Yaumara Ferrer Márquez:** Curación de datos, Análisis formal, Metodología, Visualización

*Los autores declaran que no existen conflicto de interes*