

CERTIFICADO DE VALIDACIÓN MÉTODO SALMOQUICK



Certificamos que el método y/o productos:

SALMOQUICK de MICROKIT (Y los medios en él empleados: **Buffered Peptone Neutralizing Water, SS Broth, Cromosalm Agar y XLD Agar Ref.MICROKIT DMT011, DMT067, DMT500 y DMT142 y medios preparados derivados**), cumple con los estándares de **VALIDACIÓN** en base a la Norma **UNE-EN-ISO 16140:2003**, cuyos resultados se anexan. La validación ha sido realizada mediante comparación por el método de pares, frente a los métodos oficiales de referencia: ISO 11133 de control de calidad de medios de cultivo, ISO 6579 de Salmonella y con cepas cuantitativas de referencia diana, interferentes y acompañantes. Las validaciones de MICROKIT son inspeccionadas y certificadas en el alcance por terceros (TÜV Rheinland en sus auditorías ISO 9001).

Esta validación interna e intercomparativa ha sido elevada a intercolaborativa en colaboración con un laboratorio externo que ha participado en la misma, en muestras naturales de todo tipo de alimentos y cosméticos, de las que analiza rutinariamente, comparando los resultados Salmoquick con los del método estándar.

El presente certificado sólo es válido durante el periodo de vigencia de los métodos citados y aunque se garantiza mensualmente, mediante revalidación intercomparativa SEILA (para todo tipo de alimentos y cosméticos), habrá de ser renovado antes de cinco años desde su fecha de emisión, indicada al pie, siempre que haya cambios de diseño que puedan afectar significativamente los resultados.

Este certificado autoriza a todo usuario del método validado, a respaldarse en los estudios de validación de MICROKIT si Sanidad le exige la validación interna de su método en concreto con sus propias matrices, equipos, analistas y sus instalaciones, siempre que se empleen los métodos, matrices y productos referenciados y amparados en este certificado.

Garantizado por:



Jorge Sanchis Solera

Coordinador Intercomparativos SEILA y Director de Calidad MICROKIT®

A fecha: 09-Diciembre-2014

Actualizado a fecha: 04/03/2021

INFORME DE VALIDACIÓN CUALITATIVA SOBRE LA INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE *Salmonella spp* EN UN LABORATORIO COSMÉTICO Y ALIMENTARIO MEDIANTE EL MÉTODO RÁPIDO DE 48 h DE MICROKIT: BPNW, SS Broth, XLD Agar, CROMOSALM Y DRYPLATES-SAL

1. Objetivos

Comprobar si el método de detección de *Salmonella spp* utilizado en nuestro laboratorio de análisis microbiológicos de productos cosméticos/alimentos, detecta este microorganismo adecuadamente en las muestras procesadas. Es decir, comprobar que la técnica utilizada, los medios de cultivo, equipos e instalaciones utilizados, así como los analistas que desarrollan el control rutinario de detección de *Salmonella spp*, son idóneos, con resultados aptos y fiables, determinados mediante la sensibilidad, la especificidad y el límite de detección de nuestro método en nuestras muestras concretas.

2. Alcance

Las muestras de cosméticos/alimentos analizadas en nuestro laboratorio.

3. Parámetros

El parámetro objeto de la presente validación es la detección de las cepas de *Salmonella spp* a 35-37°C.

4. Diseño del experimento

Analizaremos con el método habitual-ver publicación- empleado en este laboratorio (Buffered Peptone Neutralizing Water BPNW, SS Broth, XLD Agar y Cromosalm Agar -o DryPlates®-X-Salm-), duplicado con el método más habitual del mercado (ISO 6579), un número de muestras suficiente que, previamente, habremos contaminado con cantidades conocidas muy precisas de microorganismos diana, interferentes y acompañantes. Así podremos comparar los resultados finales obtenidos con los resultados esperables (al emplear a la vez cepas cuantitativas) y aplicar las técnicas estadísticas adecuadas, lo más inteligibles posible, para evaluar el nivel de efectividad. Éste se podrá calcular mediante los parámetros estándar de validación cualitativa (Sensibilidad, Especificidad y Límite de detección, así como la Conformidad o probabilidad de iguales resultados en muestras idénticas). De este modo podremos tomar la decisión según el método quede o no quede validado en nuestro laboratorio (es decir, la Sensibilidad, la Especificidad, el Límite de detección y la Conformidad cumplan con los estándares internacionales de aceptabilidad). Y todo ello con los tipos de muestras que analizamos habitualmente, con nuestros equipos, con nuestros medios de cultivo, en nuestras instalaciones, mediante nuestros analistas... con una demostración basada en el método científico y en pruebas documentales.

El número de muestras elegido para esta validación secundaria (al estar el método elegido en origen ya validado por el proveedor, de modo que lo que validamos aquí es la aplicación del protocolo en NUESTRAS muestras) se podría haber calculado de acuerdo con el criterio estándar de ser mayor o igual a la raíz cúbica del número de muestras que analizamos anualmente, por lo que al ser éstas menos de 1000, un número de 10 sería el adecuado. Sin embargo, al parecernos muy pocas, elegiremos un término intermedio entre dicho criterio y el otro, menos extendido, de elegir la raíz cuadrada del número de muestras, de modo que de 1000 muestras analizadas al año, la raíz cuadrada serían 32 muestras para la

validación. El número intermedio entre 10 y 32 preferimos que sea de 20, ya que con dicho número, 1 fallo de 20 muestras positivas ó 1 fallo de 20 muestras negativas representan respectivamente el 5%, justo la proporción de muestras que internacionalmente se considera como valor máximo aceptable de errores (tanto en falsos positivos como en falsos negativos) en ensayos cualitativos. Realizaremos pues el análisis de validación en 20 muestras contrastadamente positivas (para calcular la especificidad) y en 20 muestras contrastadamente negativas (para calcular la sensibilidad); Y de los negros (cepas sin muestra directamente inoculadas en placas) para verificar si la concentración actual de las cepas coincide con la del certificado del proveedor (para, de no ser así, tener en cuenta el recuento actual más que el certificado). Estas muestras negras no es necesario que sean 20, podemos hacer por ejemplo 6, una para cada cepa, en los medios de cultivo de la validación y/o los del certificado del proveedor, así, todas estas placas de negros en triplicados (Cromosalm, XLD y DryPlates®-X-Salm). Añadiremos otras 20 muestras para calcular el límite de detección, con la cepa diana a cada vez menor concentración, para evitar que el hecho de hacerlo en parte de las 20 muestras positivas, interfiriese así en los resultados de sensibilidad, con supuestos falsos negativos que se deberían en realidad al hecho de utilizar cepas en valores muy bajos.

En cuanto a la naturaleza de las muestras, existen dos criterios enfrentados: Según unos autores deben hacerse muestras mixtas que representen todos los tipos cosméticos que fabricamos y alimentos que analizamos (excepto aquéllos de demostrada capacidad inhibitoria intrínseca donde inocular cepas no sirve para nada porque luego no son capaces de crecer), a fin de tener una muestra más representativa de todo lo que fabricamos/analizamos. Según otros autores, debemos elegir sólo las matrices que más problemas microbiológicos nos hayan dado históricamente, porque si no los buenos resultados de las otras enmascararían los resultados más críticos. Como ambas posturas nos parecen igualmente razonables (ya que si elegimos sólo la segunda no vamos a saber mediante la validación si, cuando en nuestros análisis rutinarios no obtenemos crecimientos, se debe a que no hay microorganismos, o se debe a que los conservantes inhiben tan bien que nuestro método no es capaz de detectar adecuadamente aunque los microorganismos estén presentes), decidimos hacer conjuntamente la mitad.

Empleamos muestras naturales, sin irradiar, ya que la presencia previa de Salmonella que pudiese interferir en la validación (en los negativos) es muy poco probable.

Además aprovechamos para intentar validar en nuestras muestras, como método alternativo, las DryPlates®-SALM, junto a las placas de medio convencional clásico Cromosalm y XLD por siembra en superficie por estría, de modo que el estudio se realiza en realidad con 180 placas, 60 positivas, 60 negativas y 60 positivas débiles, que, al no ser para recuentos, no precisan duplicados de placas por cada muestra. Tratándose la presente de una validación secundaria (al estar tanto las placas del medio Cromosalm, XLD y DryPlates®-SALM, validadas primariamente por el proveedor, cuyo certificado se anexa a la presente validación), el número de datos finales será más que suficiente, lo que nos permitirá después aplicar una estadística más simple y comprensible para todos.

Previamente habremos inoculado en nuestras propias matrices, varias cepas (cuantitativas, de referencia, trazables, con indicación de su incertidumbre inicial), siguiendo el método que queremos validar, así dopado con cepas de referencia, lo que nos permitirá conocer el valor esperable, para así compararlo con el valor obtenido y poder tomar decisiones acordes a los criterios de aceptabilidad

estándar. Las cepas usadas persiguen el objetivo de emplear especies bacterianas interferentes y acompañantes en las muestras, además de los microorganismos diana. Para mejorar la Inclusividad en la Selectividad del método, hemos empleado 2 cepas diana diferentes y para mejorar la Exclusividad en la Especificidad del método, hemos empleado varios interferentes (cepas no-diana que puedan llegar a interpretarse como falsos positivos).

En el caso concreto de detección de *Salmonella spp* elegimos las dos dianas más habituales (*Salmonella enteritis* y *Salmonella typhimurium*), 2 cepas diferentes como interferentes *Proteus mirabilis* y *Citrobacter freundii* al tener características bioquímicas y de crecimiento en placas de agares clásicos (y otros medios cromogénicos para *Salmonella*) muy similares a la diana, a un nivel al menos similar y como acompañantes al menos otras dos cepas que sepamos que pueden crecer en los caldos elegidos aunque su morfología colonial sea muy diferente a la diana o incluso no crezcan en la placa, por ejemplo *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, a una concentración similar que las dianas y los interferentes, para que dificulten en el caldo de enriquecimiento la proliferación de las dianas. Ya que si sólo eligiésemos diana o si los acompañantes fuesen inviables en los medios usados, o si añadiésemos cantidades elevadas de diana y bajas de interferentes o acompañantes, la validación quedaría en entredicho, al no ponerse en el peor de los casos (incluso en cosméticos donde la probabilidad de encontrar tanta flora es muy escasa).

Se calculan cuántos ml y de qué concentración del banco de diluciones se debe partir para obtener finalmente en la muestra un número lo más cercano posible al mínimo ideal de 25 ± 11 ufc de las dianas por 25 gramos o mililitros de la muestra. Para estudiar la sensibilidad y la especificidad, sería muy imprudente intentar llegar a un número inferior porque la incertidumbre microbiológica nos asegura que por debajo de este número habrá diversas alícuotas de 1 g ó ml con 0 ufc aunque estemos toda la mañana agitando para homogeneizar la muestra cuya media es de 5 ufc/g ó ml, lo cual anularía la validación); de 25 ± 4 ufc de las interferentes y de 50 ± 13 ufc de cada acompañante. En cambio para estudiar el límite de detección añadiremos otras tantas muestras con cantidades cada vez menores de la diana (ej: 20 , 15 , 10, 8 , 6, 5, 4, 3, 2, 1 de *Salmonella enteritis* y/o de *Salmonella typhimurium*)

bajando proporcionalmente también las cantidades de interferentes y acompañantes.

Para dichos cálculos se puede aplicar la fórmula lógica $V_{\text{cepa}} \times [\text{cepa}] = V_{\text{necesario}} \times [\text{final necesaria}]$, de donde: $V_{\text{necesario}} = V_{\text{cepa}} \times [\text{cepa}] / [\text{final necesaria}]$

O bien la regla de tres simple para ver cuántos µl de inóculo necesitaremos por cada muestra y cuantos ml de inóculo necesitaremos para el total de muestras. Por ejemplo, si tenemos *Salmonella enteritis* a concentración $(6 \pm 2.68)10^3$ ufc/lentícula, al añadir esa lentícula en 10 ml de Ringer, la concentración de este primer tubo (dilución 0) será de $6 \pm 2.68 \times 10^2$ ufc/ml. Haciendo una primera dilución del tubo madre en 9 ml de Ringer, obtendremos $6 \pm 2.68 \times 10^1$ ufc/ml, (60 ± 26.8) ufc/ml, del que necesitamos inocular 6 ml en cada muestra positiva (6×60 ufc/muestra de 25 g para obtener 14,4 ufc g, que ya es un valor muy cercano al de 15 ufc/g arriba comentado y lo dejamos así porque de este modo no hace falta jugar con números extraños de µl). En el ejemplo, si vamos a necesitar inocular 6 ml de esta dilución -1 en cada muestra y tenemos 20 muestras positivas, necesitaremos 120 ml (12 tubos Ringer 10 ml de esta dilución), así como algunos adicionales para las 20 muestras de positivos débiles.

Como tenemos *Salmonella typhimurium* a concentración $5,48 \pm 2.52)10^3$ ufc/lentícula, al añadir esa lentícula en 10 ml de Ringer, la concentración es de $5,48 \pm 2.52 \times 10^2$ ufc/ml. Haciendo una primera dilución del tubo madre en 9 ml de Ringer, obtendremos $5,48 \pm 2.52 \times 10^1$ ufc/ml.

El *Citrobacter freundii* con una concentración de $(1,74 \pm 0,09) 10^7$ ufc/lentícula, al añadir esa lentícula en 10 ml de Ringer, la concentración es $1.74 \pm 0.09/10^6$ ufc/ml, al añadir 1 ml en 9 ml de Ringer, la concentración es de $1.74 \pm 0.09 \times 10^5$ ufc/ml. Haciendo otra dilución de este tubo en otro de 9 ml de Ringer, obtendremos $1.74 \pm 0.09 \times 10^4$ ufc/ml. Y en la siguiente dilución $1.74 \pm 0.09 \times 10^3$ ufc/ml. Y en la siguiente $1.74 \pm 0.09 \times 10^2$ ufc/ml.

En *Proteus mirabilis* la concentración es de $(1,66 \pm 0,29)10^5$ ufc/lentícula, al añadir esa lentícula en 10 ml de Ringer, la concentración es de $(1,66 \pm 0,09) \times 10^4$ ufc/ml. En la siguiente dilución en tubo de 9 ml Ringer obtenemos $1.66 \pm 0,09) \times 10^3$ ufc/ml, y en la siguiente dilución obtendremos $(1,66 \pm 0,09) 10^2$ ufc/ml,

En *Pseudomonas aeruginosa*, con una concentración de $(7,24 \pm 1,20) \times 10^6$ ufc/lentícula, al añadir esa lentícula en 10 ml de Ringer, la concentración es $(7,24 \pm 1,20) 10^5$ ufc/ml, en la siguiente dilución en tubo de 9 ml Ringer, la concentración es de $(7,24 \pm 1,20) 10^4$ ufc/ml, en la siguiente dilución obtenemos $(7,24 \pm 1,20) 10^3$ ufc/ml y en la siguiente obtendremos $(7,24 \pm 1,20) 10^2$ ufc/ml

El *Staphylococcus aureus*, con una concentración de $(2,32 \pm 0,61) \times 10^7$ ufc/lentícula, al añadir esa lentícula en 10 ml de Ringer, la concentración es de $(2,32 \pm 0,61) 10^6$ ufc/ml, en la siguiente dilución en 9 ml de Ringer, la concentración es de $(2,32 \pm 0,61) 10^5$ ufc/ml, en la siguiente dilución obtendremos $(2,32 \pm 0,61) 10^4$ ufc/ml, en la siguiente $(2,32 \pm 0,61) 10^3$ ufc/ml y en la siguiente $(2,32 \pm 0,61) 10^2$ ufc/ml.

Se ha de tener en cuenta que el volumen final inoculado de cada dilución de cepa sea suficiente para inocular todas las muestras y los blancos de cepas sin muestra. Y recordar que la muestra de 225 ml en la que están los 25 g de muestra -muestra tratada-, diluye por 10 la concentración que añadamos por gramo, de modo que para que en 1g de muestra haya 5 ufc, habremos de añadir 125 ufc en los 25 g, es decir, en el frasco de 250 ml de muestra diluida; y para ello habrá cepas de las que por tener concentración inicial alta necesitaremos poco volumen y otras cepas que por tener concentración inicial muy baja podría necesitarse el lote completo de dicha cepa para las 20 muestras positivas y las 20 positivas débiles. Por ello estos cálculos y su revisión requieren la mayor concentración y un buen rato de la jornada. Podría ocurrirnos que añadiendo sólo 25 ufc de diana en los 25 g (en los 250 ml), como vamos a incubar todo junto para enriquecer, obtendríamos después un límite de detección desde 1 ufc/g; reiteramos que es jugar con fuego hacer semejante afirmación dada la amplia incertidumbre microbiológica y aunque en improbable caso de que el experimento saliese bien en los 20 casos positivos, nadie garantizaría que volviera a suceder correctamente en los análisis rutinarios. Por eso los positivos serán a un nivel superior.

Las cepas diana se siembran siempre después de las demás: en el caso de las validaciones cualitativas, para evitar contaminaciones en las muestras negativas; en el caso de las validaciones cuantitativas, además, para minimizar el tiempo durante el cual podrían multiplicarse a la espera durante el experimento.

Se reproduce mejor una situación real, añadiendo a cada muestra (y en cada rango) diferentes proporciones de cada una de las cepas interferentes y acompañantes, incluso añadiendo en algunas muestras sólo uno de los interferentes (y todos o alguno de los acompañantes) y en otras sólo uno de los acompañantes (y todos o alguno de los interferentes).

El experimento se inicia el lunes día 20 de Octubre de 2014, los resultados se leen el día 21 y el 22, las confirmaciones de que las cepas inoculadas son las obtenidas son directas gracias al Cromosalm Agar y el informe se acaba de redactar para enviar a corrección por parte de la empresa asesora MICROKIT el día 26 de Noviembre de 2014, que nos lo devuelve corregido y conforme el día 9 de Diciembre de 2014.

5. Herramientas utilizadas

5.1 Material de laboratorio e instrumental necesario

Para la realización de la presente validación es necesaria la utilización del siguiente material de laboratorio:

- Micropipeta rango 100 - 1000µL
- Micropipeta rango 10 - 100µL
- Puntas para micropipeta
- Agitador Vórtex
- Autoclave
- Estufa a 37°C ± 2,5°C
- Nevera
- Probetas estériles
- Botes de 100 ml estériles
- Alcohol de 70° o toallitas desinfectantes
- Pinzas estériles
- Mechero bunsen
- Cabina de flujo laminar
- Contador de colonias
- Placas de 90 mm estériles
- Balanza

5.2 Medios y diluentes utilizados

Medios y kits de MICROKIT	Lote y caducidad
Buffered Peptone Neutralizing Water	1411/2410-6, 30/07/2018
Salmonella-Shigella Broth	1410/2382-162, 30/05/2018
Cromosalm Agar	136545/104, 28/02/2019
XLD Agar	1410/2379-23, 30/08/2019
DryPlates®-SAL	1466/2318A-6, 05/06/2015

5.3 Material biológico utilizado

Suspensiones de cepas cuantitativas de reserva, trazables, con indicación de su incertidumbre inicial a partir de las cuales se prepara el inóculo.

Cepas MICROKIT	Concentración \pm Incertidumbre	Lote	Caducidad
<i>Salmonella enterica ser. typhimurium</i> WDCM 00031	$(5,48 \pm 2.52)10^3$ ufc/lentícula	116-100826	02/2012
<i>Salmonella enteritidis</i> WDCM 00030	$(6,0 \pm 2.68)10^3$ ufc/ lentícula	116-100445	07/2012
<i>Proteus mirabilis</i> WDCM 00023	$(1,66 \pm 0,29)10^5$ ufc/ lentícula	118-091125	05/2011
<i>Citrobacter freundii</i> WDCM00077	$(1,74 \pm 0,09) 10^7$ ufc/ lentícula	118-093452	06/2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM00114	$(7,24 \pm 1,20) \times 10^6$ ufc/ lentícula	342-081013R2	02/2012
<i>Staphylococcus aureus</i> WDCM00035	$(2,32 \pm 0,61) \times 10^7$ ufc/ lentícula	112-091021	10/2011

5.4 Muestras empleadas

A:Tarta de gazpacho
B:Salchichas de pollo
C:Colorante alimentario
D:Ternera picada
E:Mix de embutidos (Salchichón con pimienta +chorizo con pimentón)
F:Queso curado
G:Lácteo Danacol
H: Semillas de Cacao
I:Ensalada verde
J: Bicarbonato sódico
K:Pescado: bacalao salado
L:Albúmina
M:Macedonia de frutas
N:Ensaladilla rusa
Ñ:Barrita de cereales (con fresa y yogur)
O:Ovoproducto: Salsa César
P:Harina de maíz amarilla
Q:Bebida alcohólica de hierbas
R:Mezcla de especias(Sazonador de pollo,curry,canela,cúrcuma,nuez moscada,cacao,jengibre,pimienta negra,ajo,café y cominos
S:Emulsión hidratante (Cosmética)

6. Procedimiento

6.1 Operativa con muestras inoculadas.

La técnica realizada en el laboratorio se puede resumir de la siguiente manera:

Primero se verifica que las propiedades organolépticas (aspecto, olor) de las matrices es correcto, sobre todo si se tratase de matrices que hubiéramos tenido que irradiar para eliminar flora desconocida (lo cual no suele ser necesario en cosméticos pero si en alimentos, aunque no en este caso de Salmonella).

- Para el estudio de sensibilidad y especificidad preparamos 3x20 frascos/bolsas stomacher estériles, cada uno con 225 mls de BPNW y cada una con 25 g de la misma muestra (total 20 muestras triplicadas diferentes, 20 para sensibilidad, 20 para especificidad y 20 para límite de detección), así como 6 placas adicionales de cada medio para los negros de cepas sin muestra (uno para cada cepa). Tomamos las muestras de las 6 cepas para plaquear directamente de su dilución más idónea y conocer la concentración real actual de cada cepa patrón, por si acaso es ahora muy diferente a la certificada por el proveedor en origen. Y por fin un blanco de muestra-mix sin cepas inoculadas, para contrastar que las matrices no contenían en origen los microorganismos diana (si no se irradiaron).
- Reconstituimos las cepas de laboratorio en tubos de 10 ml de Ringer ¼ solución isotónica. Con meticulosidad para no perder ninguna de las lentejas que conforman las mismas, para que no se queden pegadas a las paredes del tubo (lo que dificultaría y retrasaría su disolución) y bajen al fondo, dejando 10 minutos que se empapen y agitando después con un vortex para conseguir una correcta homogeneización.
- Hacemos los cálculos para determinar la cantidad de inóculo que se deberá traspasar a cada bolsa stomacher para conseguir la cantidad de colonias que queremos en cada ml final. Es necesario diluir más las cepas de alta concentración pasando 1 ml del tubo inicial de 10 ml a un tubo de 9 ml de Ringer 1/4 y así sucesivamente hasta conseguir la concentración deseada por cada ml de Ringer (que recordemos, se añadirá a 25 g de muestra, no a 1 g). Es más fácil partir de todas las cepas a la misma concentración exponencial para así no complicar los cálculos ni promover errores. Una vez determinado este valor traspasamos dicho volumen de inóculo a los bolsas stomacher con muestras con micropipeta y puntas estériles. Tras ello, agitamos las muestras para su correcta homogeneización momentos antes de cada inóculo.
- La concentración teórica obtenida de los distintos microorganismos inoculados en las **muestras positivas** se detalla en la siguiente tabla:

<i>Salmonella enterica ser. typhimurium</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
25 ± 11	15 ± 7	25 ± 4	25 ± 1	50 ± 8	50 ± 13

Es mejor ir variando la proporción de interferentes+acompañantes en las diferentes muestras, incluso eliminando algún acompañante (ningún interferente) en alguna muestra.

- La concentración teórica obtenida de los distintos microorganismos inoculados en las **muestras negativas** se detalla en la siguiente tabla:

<i>Salmonella enterica ser. typhimurium</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
0	0	25 ± 4	25 ± 1	50 ± 8	50 ± 13

Es mejor ir variando la proporción de interferentes+acompañantes en las diferentes muestras, incluso eliminando algún acompañante (ningún interferente) en alguna muestra.

- Para estudiar el límite de detección añadimos en 20 muestras **positivos débiles**, cantidades cada vez menores de la diana (ej: 8 , 6 , 4 , 2), bajando proporcionalmente también las cantidades de interferentes y acompañantes. La concentración teórica obtenida por muestra se detalla en la siguiente tabla:

	<i>Salmonella enterica ser. typhimurium</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
A:		20		25	20	22
B:	20		25		20	22
C:		15		12	20	22
D:	15		12		20	22
E:		10		8	20	22
F:	10		8		20	22
G:		8		7	20	22
H:	8		7		20	22
I:		6		6	20	22
J:	6		6		20	22
K:		5		5	20	22
L:	5		5		20	22
M:		4	4	4	20	22
N:	4		4	4	20	22
Ñ:		3		3	20	22
O:	3		3		20	22
P:		2		2	20	22
Q:	2		2		20	22
R:		1	1	1	20	22
S:	1		1	1	20	22

- Una vez inoculadas con las cepas las 20 muestras positivas y las 20 muestras negativas en sendas bolsas de 25 g de muestra + 225 ml de BPNW, así como las 20 muestras positivas débiles del límite de detección, se añade a cada una 18 ml de SS Broth a [x5] y se procede a incubarlas todas juntas y al mismo tiempo, 18-24h a 30-35 °C.
- Por cada frasco incubado, esté o no turbio y/0 virado a negro, realizaremos tres ensayos: uno estriando el caldo enriquecido en XLD Agar, otro estriando en Cromosalm Agar y otro estriando en DryPlates®-SAL previamente hidratada con 1 ml de agua estéril. Todas las placas de medios se incuban (todas las placas juntas e introduciéndolas a la vez en la estufa) a 30-35°C durante 18-24 h, no apilando más de 8 placas ni permitiendo que las columnas se toquen entre si, ni a las paredes/suelo/techo de la estufa. Se tiene especial cuidado en que las DryPlates no toquen el suelo de la estufa, ni las paredes ni el techo, y que haya dos vasos llenos de agua en la estufa para proporcionar humedad.
- Si sabemos que nuestros productos son muy inhibitorios, la incubación de los frascos se prolongaría otras 24 h (hasta 48 h) y después se volvería a sembrar cada muestra en otras respectivas placas.
- Transcurrido el tiempo de incubación se estudia la aparición o no de colonias típicas diana en cada placa positiva y negativa. No se trata de contarlas, ya que esta es una validación cualitativa y contar tras enriquecer no tiene el menor sentido. Se trata de ver si hay o no crecimiento de cepas diana, tanto en los positivos, como en los negativos, como en los positivos débiles.

6.2 Control de la concentración actual de las cepas en nuestro laboratorio (tabla de los negros).

Cepas MICROKIT	Concentración teórica inoculada	Rto. Real medio en 3 placas XLD/ lentícula	Rto. Real medio en 3 DryPlates/ lentícula	Rto.Real medio en 3 placas Cromosalm/lentícula
<i>Salmonella enterica ser. typhimurium</i>	60 ± 28 ufc/0,1 ml =placa	53	62	61
<i>Salmonella enteritidis</i>	55 ± 25 ufc/0,1 ml =placa	48	54	50
<i>Proteus mirabilis</i>	17 ± 3 ufc/0,1 ml =placa	12	8	5
<i>Citrobacter freundii</i>	17 ± 1 ufc/0,1 ml =placa	14	7	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72 ± 12 ufc/0,1 ml =placa	2	3	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	23 ± 6 ufc/0,1 ml =placa	0	0	0

Si en las cepas diana este recuento hubiese resultado significativamente diferente (>/<50%) del valor certificado por el proveedor de las cepas (o siendo más estrictos, si estuviese fuera de la incertidumbre certificada), se tomarían como base del estudio estos resultados reales obtenidos, en lugar de los certificados por el proveedor. Se concluye a la vista de estos resultados que las lentículas se mantienen con un recuento y una variabilidad perfectos respecto al certificado en origen por el proveedor, que por tanto se toma como referencia, en vez de los negros.

7. Resultados

0) Blanco:

Se demuestra que no hay crecimiento de la diana (*Salmonella spp.*), de modo que la matriz ha sido correctamente irradiada y/o liberada de cepas sorpresa.

a) Placas con inóculo positivo (acompañantes e interferentes CON CEPA DIANA) en el Caldo presuntivo (virado a negro)

MATRICES Y CEPAS	POSITIVOS FUERTES: ENNEGRECIMIENTO EN LA BOLSA DESPUÉS DE 24 H A 35°C=
A	SI
B	SI
C	SI
D	SI
E	SI
F	SI
G	ENNEGRECIMIENTO EXTRAÑO
H	SI
I	ENNEGRECIMIENTO EXTRAÑO
J	NO
K	SI
L	SI
M	SI
N	SI
Ñ	SI
O	SI
P	SI
Q	SI
R	SI
S	SI

17/20 presuntos positivos rápidos (en 24 h) (85%)

2/20 presuntos positivos rápidos (en 24 h) débiles o dudosos

1/20 falso negativo (5%)

Se demuestra que la sensibilidad en el método corto de sólo 24 h es del 85%, insuficiente pero demoledoramente válida como aviso de probable presencia de Salmonella

- b) Placas con inóculo positivo débil (acompañantes e interferentes CON CEPA DIANA A BAJAS CONCENTRACIONES) en el Caldo presuntivo (virado a negro)

MATRICES Y CEPAS	ENNEGRECIMIENTO EN LA BOLSA DESPUÉS DE 24 H A 35°C= POSITIVO DEBIL
A	SI
B	SI
C	SI
D	SI
E	SI
F	SI
G	SI
H	SI
I	SI
J	ENNEGRECIMIENTO EXTRAÑO
K	SI
L	NO
M	SI
N	SI
Ñ	SI
O	SI
P	SI
Q	ENNEGRECIMIENTO EXTRAÑO
R	ENNEGRECIMIENTO EXTRAÑO
S	NO

15/20 presuntos positivos rápidos (en 24 h) (75%)

3/20 presuntos positivos rápidos (en 24 h) débiles o dudosos

2/20 falso negativo (10%) en positivos débiles

Se demuestra que la sensibilidad en el método corto de sólo 24 h para positivos débiles es del 75%, insuficiente pero demoledoramente válida como aviso de probable presencia de Salmonella

- c) Placas con inóculo NEGATIVO (acompañantes e interferentes SIN CEPAS DIANA) en el Caldo presuntivo (no virado a negro)

MATRICES Y CEPAS	ENNEGRECIMIENTO EN LA BOLSA DESPUÉS DE 24 H A 35°C= NEGATIVO
A	NO
B	NO
C	NO
D	SI
E	NO
F	NO
G	NO
H	SI
I	NO
J	NO
K	NO
L	NO
M	NO
N	NO
Ñ	NO
O	NO
P	NO
Q	NO
R	NO
S	NO

2/20 falsos positivos rápidos (en 24 h)

18/20 negativos reales (en 24h)

Se demuestra que la especificidad en el método corto de sólo 24 h para negativos es del 90%, insuficiente pero demoledoramente válida como aviso de probable ausencia de Salmonella

- d) En cuanto a las placas tras otras 24 h de incubación (total 48 horas desde las muestras)

Plasmamos sólo las placas que obtienen colonias típicas de cepa diana (+), ya que las cepas interferentes y acompañantes sólo nos han interesado hasta aquí para dificultar, pero nos da igual si crecen o no en las placas mientras no enmascaren el crecimiento de las cepas diana.

MATRICES Y CEPAS	XLD			CROMOSALM			DRYPLATES-SAL		
	+ FUERTE	+ DEBIL	-	+ FUERTE	+ DEBIL	-	+ FUERTE	+ DEBIL	-
A: Tarta gaspacho	N	N	I	V	V	I	VA	VA	I
B:Salchichas pollo	N	N	A	V	V	N+I	V+N	V+N	I
C:Colorante alimentario	N	N	SCR	V	V	SC	V	V	I
D:Ternera picada	N+A	N+A	N+A	V+N	V+N	N+I	VPA+N	VPA+N	A+N
E:Mix embutidos	N+A	N	N+I	V+N+I	V+N+I	N+I	CV+N	CV+N	I
F:Queso	N+I	I	I	V	V+I	N+I	V	3CV+N	N+I
G:Lácteo Danacol	N	N	N+I	V	V	I	V+N	V	I
H:Cacao semilla	I	A	I	V+N	N	N	N-P-D	A	N+I
I:Ensalada verde	V+N	N+C	SCR	V	V+N	SCR	V	V+N	I
J: Bicarbonato sódico	N+A	SCR	I	V+N	SCR	I	V+N	I	I
K:Bacalao salado	I	N	N+A	V	V	I	I	V	I
L:Albúmina	N	N	SCR	V	V	SCR	V	V	I
M:Macedonia de frutas	N	N	A	V	V	SCR	V	V	I
N:Ensaladilla rusa	N	N+A	N+A	V+N	V+N	N	N+V	N+V	N
Ñ:Barrita de cereales	I	N	N+I	V	V	I	V	V	I
O:OvoSalsa César	I+RN	I	I	V	I	I	V	I	I
P:Harina maíz	N	N	N+I	V	V	I	V	V	I
Q:Bebida alcohólica	RN	N	I	V	V+N	I	V	V+N	I
R:Mezcla de especias	N	N	A	V+N	V	N	V+N	V	I
S:Emulsión hidratante	N	SCR	N+I	I	SCR	I	I	I	I
COLONIAS VERDES	V, - en XLD			V, + en Cromosalm			V, + en DryPlates-SAL		
COLONIAS NEGRAS	N, + en XLD			N, Citrobacter en Cromosalm			N, Citrobacter en DryPlates-SAL		
COLONIAS INCOLORAS	I, - en XLD			I, Proteus en Cromosalm			I, Proteus en DryPlates-SAL		
COLONIAS AMARILLAS	A, - en XLD			A, Pseudomonas en Cromosalm			A, Pseudomonas en DryPlates-SAL		
SIN CRECIMIENTO	SCR								
Col, verdes poco apreciable	VPA								
REBORDE PLACA NEGRO	RN								
PLACA VERDE CON COLONIAS	VA								
PLACA VERDE SIN COLONIAS	VS								
PLACA VERDE LIGHT	VPA								
TOTAL:	3/20 falsos - (15%)	5/20 por debajo del límite de detección	8/20 falsos + (40%)	1/20 falso- (5%)	4/20 por debajo de límite de detección	0 falsos + (0%)	3/20 falsos - (15%)	4/20 por debajo del límite de detección	0 falsos + (0%)

Si se emplease el XLD habría problemas (85% de sensibilidad, 60% de especificidad), pero al emplearse el **Cromosalm Agar se obtiene un 95% de sensibilidad y un 100% de especificidad** y al emplearse el Cromosalm en el formato de las DryPlates-SAL, se obtiene un 85% de sensibilidad y un 100% de especificidad, incluso para las matrices y con las cepas interferentes más complicadas que existen, ya que en nuestra experiencia en otros medios cromogénicos para Salmonella, los interferentes Proteus y Citrobacter dan muy a menudo colonias fucsia, que son falsos positivos en dichos medios cromogénicos; por ello ni siquiera hemos tenido en cuenta dichos medios en la validación.

Combinando XLD y Cromosalm, como recomienda en origen el fabricante de estos medios, se obtiene un 100% de sensibilidad y un 100% de especificidad en TODAS las matrices.

Combinando XLD y DryPlates-SAL se obtiene un 90% de sensibilidad y un 100% de especificidad.

Conformidad: Todas las muestras similares han dado resultados idénticos.

En cuanto al límite de detección, al observar la tabla de positivos débiles, concluimos que influyen tanto el número cada vez más bajo de dianas como la proporción elevada de interferentes/acompañantes, así como el tipo de matriz:

En XLD el primer valor por debajo del cual no detectamos son 10 ufc/25 g de *Salmonella enterica ser. typhimurium* en queso; aunque es capaz de detectar desde 1 ufc/25 g de *Salmonella enteritidis* incluso en una matriz tan inhibitoria como son las especias.

En Cromosalm el primer valor por debajo del cual no detectamos son 8 ufc/25 g de *Salmonella enterica ser. typhimurium* en semillas de cacao; aunque es capaz de detectar desde 1 ufc/25 g de *Salmonella enteritidis* incluso en una matriz tan inhibitoria como son las especias.

En DryPlates-SAL el primer valor por debajo del cual no detectamos son 8 ufc/25 g de *Salmonella enterica ser. typhimurium* en semillas de cacao; aunque es capaz de detectar desde 1 ufc/25 g de *Salmonella enteritidis* incluso en una matriz tan inhibitoria como son las especias.

8. Estudio estadístico de los datos

Aunque ya hemos esbozado las conclusiones, para aprobar o no la validación del método de detección de *Salmonella spp.*, se tendrán en cuenta los siguientes parámetros que miden la calidad del análisis cualitativo:

8.1 Límite de detección es el número de ufc a partir del cual se puede detectar de forma estadísticamente significativa la presencia del microorganismo diana, sin estar sometidos a posibles interferencias ni imprecisiones. Dadas la incertidumbre microbiológica y la distribución "contagiosa" de Poisson de los microorganismos en las muestras (por más que agitemos nunca encontraremos todas las submuestras idénticas, ni en todas ellas tendrá por qué haber presencia de la cepa diana ni siquiera cuando dividiendo el número de ufc inoculadas por los ml afectados, el resultado sea > 1 ufc/g), no podemos atrevernos a certificar que el límite de detección es 1 ufc, sino el valor inóculo acompañado de su incertidumbre, siempre que éste haya sido detectado en la mayoría de muestras, como así ha sucedido, por lo que en este caso **el límite de detección demostrado EN CUALQUIER MUESTRA, para *Salmonella spp.* es de 10 ufc/25 g en Cromosalm y en DryPlates®-SAL. Y de 15 ufc/25 g en XLD.** Lo que no significa que el límite de detección no sea inferior, simplemente no hemos podido demostrarlo en este experimento.

De modo que cuando en nuestros análisis rutinarios no encontremos *Salmonella spp.*, podremos sustituir en el informe la locución "No detectado" o "No encontrado" o la atrevida afirmación "Ausente" por la más correcta expresión de los resultados: < 10 ufc/25 g al emplear a la vez Cromosalm (o DryPlates-SAL) y XLD. La pretensión de "ausencia en 25 g" no es estadísticamente demostrable a causa de la incertidumbre microbiológica, ya que por más que mezclemos para homogeneizar, nunca conseguiremos obtener con certeza 1 ufc/25 g, aunque comercialmente los clientes no entiendan que el límite de detección no es posible demostrar que es 1 ufc/25 g.

8.2 Sensibilidad: escasez de falsos negativos.

En XLD Agar hemos obtenido 3 falsos negativos de cada 20 positivos reales, un 15%, de modo que la Sensibilidad % (100 - % de falsos negativos) es del 85%, demasiado escasa.

En Cromosalm Agar hemos obtenido 1 falso negativo de cada 20 positivos reales, un 5%, de modo que la Sensibilidad % (100 - % de falsos negativos) es del 95%, muy adecuada.

En DryPlates®-SAL hemos obtenido 3 falsos negativos de cada 20 positivos reales, un 15%, de modo que la Sensibilidad % (100 - % de falsos negativos) es del 85%, demasiado escasa.

Internacionalmente se acepta que una Sensibilidad igual o mayor al 95% es suficiente para dar un método o medio como válido en este parámetro, incluso algunos autores aceptan hasta un 90 % de Sensibilidad.

De todas formas, como el método obliga a emplear dos medios, la combinación XLD y Cromosalm (como recomienda en origen el fabricante de estos medios), obtiene un 100% de sensibilidad en TODAS las matrices. Y la combinación XLD y DryPlates-SAL obtiene un 90% de sensibilidad, suficiente aunque más ajustada que con XLD y Cromosalm.

8.3 Especificidad: escasez de falsos positivos.

El XLD da problemas (sólo, 60% de especificidad), pero al emplearse obligadamente junto al **Cromosalm Agar, que obtiene un 100% de especificidad**, la especificidad del método es del 100%.

Al emplearse el Cromosalm en el formato de las DryPlates-SAL, se obtiene también un 100 % de especificidad.

Y todo esto incluso para las matrices y con las cepas interferentes más complicadas que existen, ya que en nuestra experiencia en otros medios cromogénicos para Salmonella, los interferentes Proteus y Citrobacter dan colonias fucsia, que son falsos positivos en dichos medios cromogénicos; por ello ni siquiera hemos tenido en cuenta dichos medios en la validación.

Internacionalmente se acepta que una Especificidad igual o mayor al 95% es suficiente para dar un método o medio como válido en este parámetro, incluso algunos autores aceptan hasta un 90 % de Especificidad. Por tanto, tanto el Cromosalm como las DryPlates-SAL cumplen la validación de métodos cualitativos en el tema de Especificidad (asi como el XLD cuando se combina con uno de estos dos métodos).

De todas formas, como el método obliga a emplear dos medios, la combinación XLD y Cromosalm (como recomienda en origen el fabricante de estos medios), obtiene un 100% de especificidad en TODAS las matrices. Y la combinación XLD y DryPlates-SAL obtiene también un 100% de especificidad en todas las muestras.

8.4 Conformidad: medida de Precisión en validaciones cualitativas.

Aunque no hemos hecho duplicados de placas, si se pueden considerar duplicadas la mayoría de muestras positivas, al menos todas las impares para *Salmonella enteritidis* y todas las pares para *Salmonella enterica ser. typhimurium*. Cada falso negativo y cada falso positivo debería considerarse una

inconformidad, de modo que al no haber hecho duplicados de placas se puede asimilar la conformidad a la eficiencia (que es la media entre la sensibilidad y la especificidad): en XLD hay 11 discrepantes de 40 muestras (72,5 % de conformidad), en Cromosalm 1/40 (97,5 % de conformidad) y en DryPlates-SAL 3/40 (92,5 % de conformidad). Aunque no hay estándares de conformidad, las superiores al 90% del Cromosalm y de las DryPlates-SAL nos parecen más que adecuadas y la superior al 70% del XLD, mediocre.

Robustez del parámetro ensayado: Denominamos así la capacidad del parámetro *Salmonella spp.* para optimizar la conformidad de resultados entre los diferentes métodos/medios ensayados; de modo que cuanto más cercanos sean los resultados en los diferentes métodos, más robusto se considerará el parámetro. No hay que confundir esta robustez con la robustez de cada método, que viene en parte definida por los anteriores parámetros. Al ser la conformidad muy similar en ambos medios (Cromosalm y DryPlates-SAL), concluimos que la robustez de este parámetro es muy elevada. No así al comparar éstos con el XLD, cuya conformidad es muy inferior.

9. Conclusiones, calificación final de la validación según el resultado estadístico y decisión

Como consecuencia de todos estos resultados estadísticos, se demuestra que el método MICROKIT de acortamiento a 48 h de la ISO 6579 para *Salmonella*, mediante mezcla del pre-enriquecimiento revitalizador con el post-enriquecimiento selectivo, en una incubación simultánea con BPNW y SS Broth, sumado al posterior aislamiento en placas de XLD + Cromosalm (ó de XLD y DryPlates-SAL) cumplen con los 3 criterios estándar de validación cualitativa (Sensibilidad, Especificidad y Límite de detección) e incluso con los criterios adicionales de validaciones más profundas (Conformidad), por lo que dicho método se demuestra que puede ser usado de rutina en nuestros análisis:

-El **límite de detección** demostrado desde 10 ufc/25 g en el peor de los casos

-La **Sensibilidad** para la combinación XLD y Cromosalm, obtiene un 100% de sensibilidad en TODAS las matrices. Y la combinación XLD y DryPlates-SAL obtiene un 90% de sensibilidad, suficiente aunque más ajustada que con XLD y Cromosalm.

-La **Especificidad** para la combinación XLD y Cromosalm, obtiene un 100% de especificidad en TODAS las matrices. Y la combinación XLD y DryPlates-SAL obtiene también un 100% de especificidad en todas las muestras.

.La **Eficiencia** (media entre sensibilidad y especificidad) para la combinación XLD y Cromosalm es de $(100 \% + 100\%) / 2 = 100\%$. Para la combinación XLD y DryPlates-SAL es de $(90\% + 100\%) / 2 = 95\%$.

-La **Conformidad** en Cromosalm 1/40 (97,5 % de conformidad) y en DryPlates-SAL 3/40 (92,5 % de conformidad). Como en XLD es del 72,5 % , la conformidad media en la combinación XLD y Cromosalm sería del 85 % y en la combinación XLD y DryPlates-SAL del 82,5%.

Concluimos que Cromosalm, seguido de DryPlates®-SAL son los mejores medios de aislamiento en placa de Salmonella. Y que **la combinación del protocolo rápido de Salmonella: 24 h en BPNW + SS Broth [x5], seguido de estría e incubación de otras 24 h en XLD y Cromosalm (o bien en XLD y DryPlates-SAL) es un método excelente para la correcta detección de Salmonella spp. en todo tipo de muestras, que queda de este modo validado.**

Además el método de 24 horas de doble enriquecimiento BPNW + SS Broth [x5] alerta de la probable presencia de Salmonella por ennegrecimiento del caldo y aunque sólo supone el 85% de sensibilidad y el 90 % de especificidad, resulta un excelente aviso en sólo 24 horas de la probable presencia de Salmonella. Aunque ennegrezca o no, hay que seguir con la segunda incubación de las placas otras 24 horas.

Y dejaremos la posible optimización del límite de detección y el mantenimiento de la Eficiencia (Sensibilidad y Especificidad) y de la Concordancia para los futuros ensayos intercomparativos en que participaremos, cuyos informes anexaremos a la presente validación.

Por todo ello, se considera validado el parámetro de detección de *Salmonella spp* en nuestras muestras con el protocolo seguido en esta validación.

Se elige continuar utilizando DryPlates®-SAL porque su manejo es mucho más rápido y cómodo, o bien Cromosalm Agar, a nuestra conveniencia. Junto con el BPNW y el SS Broth de MICROKIT.

Se complementa y se mantiene la presente validación mediante la participación en varios ejercicios de **Intercomparación** con otros laboratorios a lo largo del año.

Se considerará caducada la presente validación, y por ello habrá que repetirla, en el plazo de 5 años, o bien antes cuando haya cambios que puedan afectar de manera significativa a los resultados analíticos: cambio de personal analítico, cambio de medios de cultivo o de casa comercial aunque declaren fabricar la misma fórmula del medio, cambios de equipos relevantes, cambio de tipos de muestras, cambio del procedimiento...

10. Bibliografía

- ✚ 1992. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos.
- ✚ 1982. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas del CENAN Instituto Nacional de Sanidad.
- ✚ 1989. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Microbiología alimentaria: Detección de bacterias con significado higiénico-sanitario. Instituto de Salud Carlos III.
- ✚ Métodos de análisis microbiológicos de los alimentos. Corrie Allaert, Marta Escolá, Díaz de Santos, 2002
- ✚ DIRECTIVA EUROPEA 2073/2005 de 15 de Noviembre sobre Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Union Europea, 22.12.2005

- ✚ 2008 Recopilación de Normas microbiológicas de alimentos. Manuel Moragas (Ayuntamiento de Bilbao) y M^a Begoña de Pablo (Sanidad del Gobierno Vasco).
- ✚ ISO 7218. Microbiología de los alimentos. Reglas Generales para los análisis microbiológicos.
- ✚ ISO 6579. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de Salmonella.
- ✚ Norma ISO/TS 11133-2:2003 Microb.alim: Preparación y producción de medios de cultivo-Pruebas de rendimiento
- ✚ UNE-EN ISO 16140: Microbiología de los alimentos: Protocolo para la **validación** de métodos alternativos
- ✚ ISO 5725: Precisión de los métodos de ensayo. Determinación de repetibilidad y reproducibilidad mediante intercomparativos
- ✚ Informes SEILALIMENTOS 1 a 58 (total 2.200 páginas), Laboratorios MICROKIT, Marzo-1999 a Junio-2013
- ✚ PRT-SEILA-001: Protocolo GLOBAL **VALIDADO** para la ejecución correcta de análisis de alimentos (e intercomparativos SEILALIMENTOS) (42 páginas)
- ✚ PRT-VAL-001 Protocolo para VALIDACIÓN en microbiología (69 páginas)
- ✚ 09/2008: PROTOCOLOS MICROKIT VALIDADOS PARA ANALISIS DE ALIMENTOS. Protocolos MICROKIT para control microbiológico de alimentos, VALIDADOS mediante 10 años de ensayos intercomparativos SEILALIMENTOS. XVI Congreso microbiología de alimentos. Córdoba, 9/2008
- ✚ 05/2009: CONCLUSIONES DE LOS PROTOCOLOS MICROKIT PARA ALIMENTOS. Conclusiones sobre la validación de los protocolos MICROKIT optimizados para análisis microbiológico de alimentos frente a la normativa relacionada, mediante los ensayos intercomparativos Seilalimentos. Tecnicas de Laboratorio 341. Lifescienceslab 5.
- ✚ 07/2009: PROTOCOLOS MICROKIT VALIDADOS PARA ANALISIS DE ALIMENTOS. Protocolos MICROKIT para análisis microbiológicos de alimentos. Alimentación, equipos y tecnología 245.
- ✚ 03-2009: VALIDACION MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS. Validación de análisis de alimentos y esquema de trabajo. 12 pp. MICROKIT © 16-Julio-2009

11. ANEXOS

- Fotografías de la validación

12. Personas que han intervenido en la validación, cargos, fechas y Firmas:

Cliente anónimo de MICROKIT

Jorge Sanchis Solera, Lab.MICROKIT

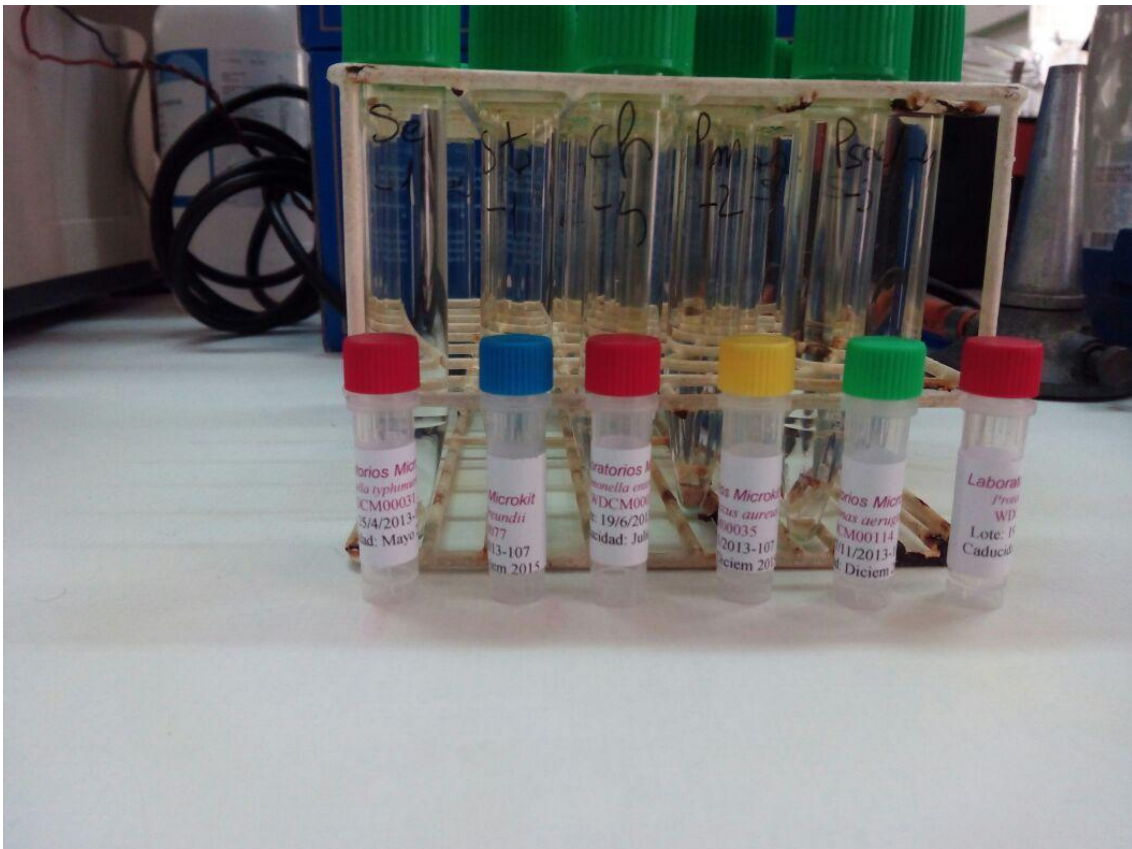
Madrid, 9 de Diciembre de 2014

ANEXO 1

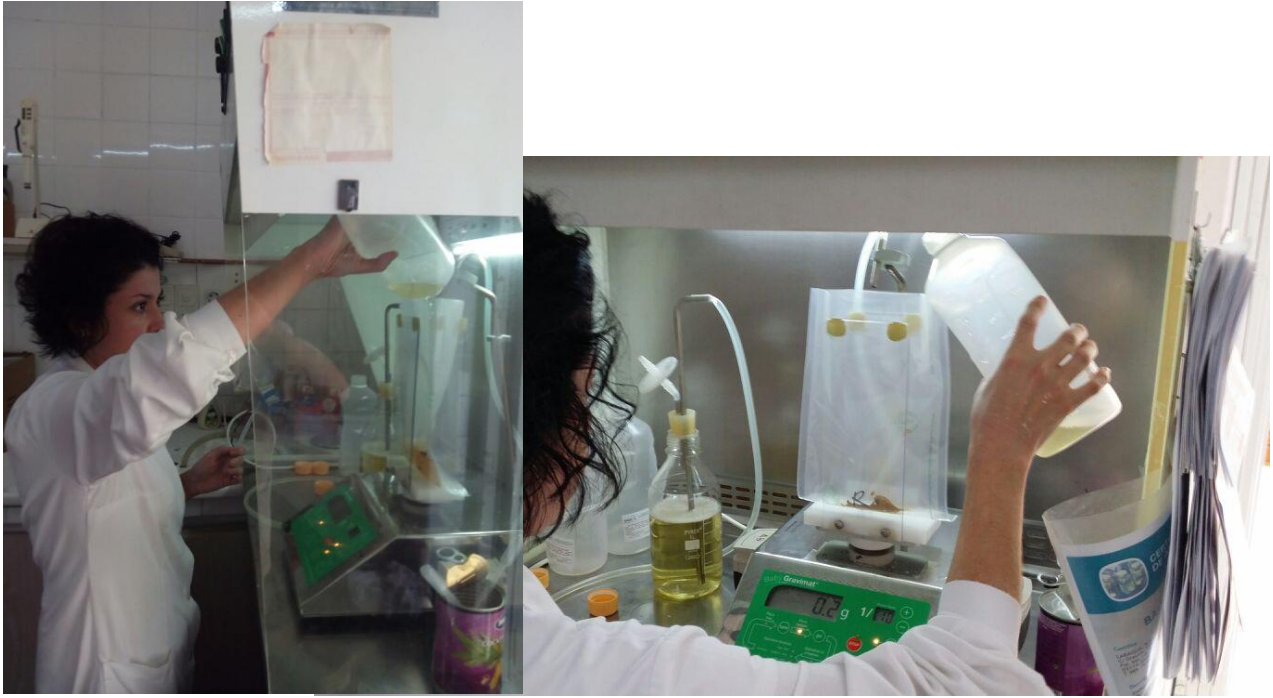
Fotografías de la validación



Diversidad de Matrices para el ensayo



Revitalización y diluciones de las cepas



Dilución de las muestras en el caldo revitalizante y neutralizante BPNW



Adición de las cepas en las muestras a concentraciones muy precisas



Homogeneización de las muestras con el BPNW y las cepas inoculadas



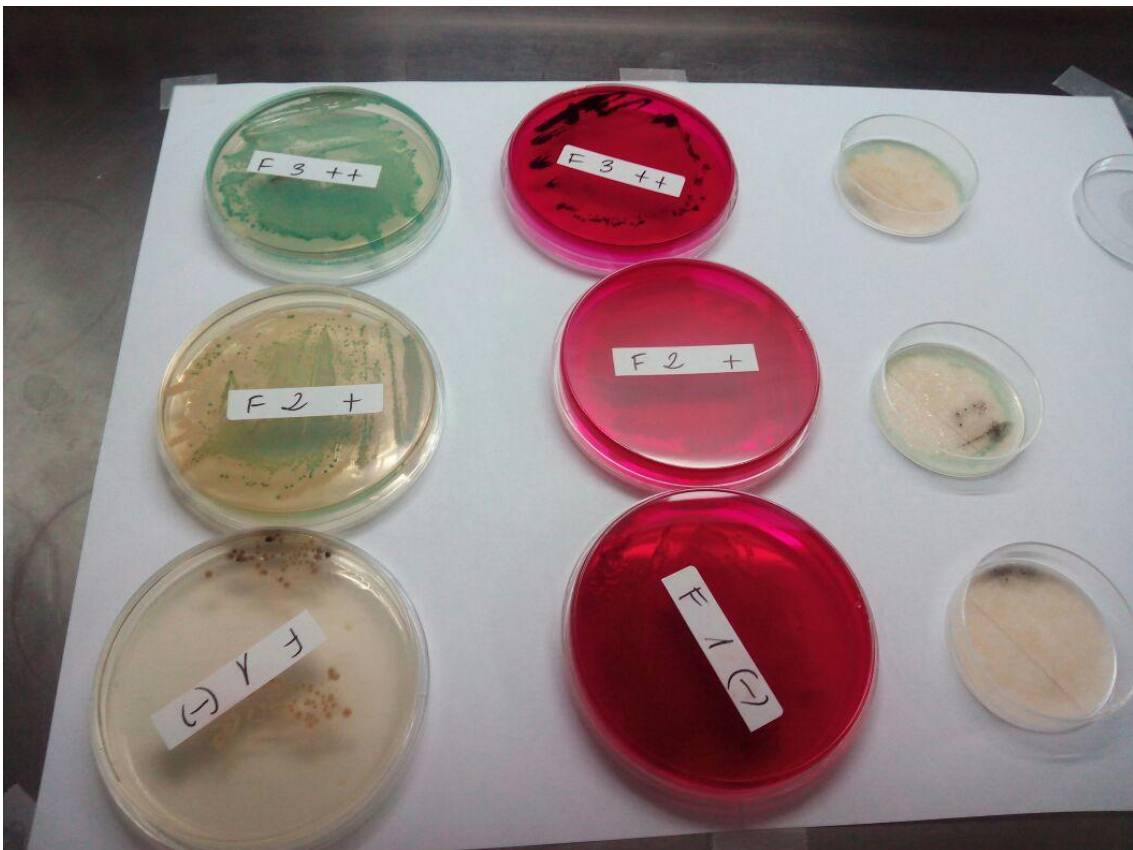
Incubación de las bolsas y de los negros



Incubación de las bolsas y de los negros



Preparando las placas para estriar los caldos incubados



Aspectos de las placas tras incubar