

CERTIFICADO DE VALIDACIÓN CompactDryPlates®-TC



Certificamos que el método y/o productos:

COMPACT-DRY-PLATES®-TC (Ref.MICROKIT 1000166), **cumple con los estándares de VALIDACIÓN de la Norma UNE-EN-ISO 16140:2003**, cuyos resultados se anexan. La validación está realizada entre 25 laboratorios colaboradores de España de todos los ámbitos, mediante comparación por el método de pares, frente a los métodos oficiales de referencia (en su mayoría Standard Methods Plate Count Agar) y con las más diversas matrices de muestras naturales de **todo tipo de alimentos, aguas y cosméticos**, de las que analiza rutinariamente cada laboratorio participante.

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, aguas y cosméticos), habrá de ser renovado antes de cinco años desde su fecha de emisión, indicada al pie.

Este certificado autoriza al usuario del método y del medio validado, a respaldarse en los estudios de validación de MICROKIT para la validación interna de su método 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:

A fecha: 03-Noviembre-2009
(Aniversario 20 años del grupo MICROKIT)

Jorge Sanchis Solera
Coordinador y Director de Calidad SEILA y MICROKIT®

❖ METODO DE VALIDACIÓN

Entre Febrero de 2008 y Septiembre de 2009 se compara un total de 1.120 muestras naturales para el parámetro de recuento total de aerobios, siguiendo el método MICROKIT® mediante CompactDryPlates®-TC, con respecto al método oficial: Normas Técnicas oficiales vigentes para microbiología: Standard Methods ISO 4833 alimentos (Plate Count Agar), ISO 6222 aguas (Yeast Extract Nutrient Agar), ISO 21149 cosméticos (Eugon LT100 Agar-LT100 Agar), Pharmacopea (Medium B Tryptic Soy Agar TSA). El nuevo sistema validado tiene grandes ventajas sobre el método clásico, al tratarse de placas preparadas pero deshidratadas (1 año de caducidad), que absorben en masa y en frío 1 ml de muestra (a diferencia de las placas preparadas clásicas), lo que ahorra el punto crítico de la fusión de agares del método tradicional para siembra en masa, así como mucha manipulación y tiempo de trabajo.

Para ello intervienen 25 laboratorios independientes (de entre los cuales, al menos 6 están acreditados para análisis microbiológicos por la Norma ISO 17025, conforme invita la ISO 17994 de equivalencia de métodos microbiológicos). Los LABORATORIOS participantes y personas responsables en cada uno fueron (por orden de entrega de resultados): ANUR-M^a Teresa Sánchez, SANICONSULT-Dr. Antonio Domenech-Sánchez, SACIM-Juan Gozalbo Gómez, NEVADA-Esther López, MANUFACTURAS SALOMON-Tomás Franco, AROMSA-M^a Angeles González Corbalán, AHUMADOS DOMÍNGUEZ-Lola Lores, A.G.ERIKSON-Carlos Vanegas, SERVICIO INTEGRAL DE CONTROL ALIMENTARIO SICA-M^a del Mar Casanova, APINEVADA-Cristina Torres Fernandez-Piñar, ARANDI ILLESCAS-Raquel Pérez Raso, SARA LEE HOUSEHOLD AND BODYCARE ESPAÑA-Juan Antonio Arrebola Valverde, AGUAS FONTVELLA Y LANJARÓN-Ana Graciela Perezagua, QUINTON INTERNATIONAL-Maria Jesús Santandreu Capón, LAB.SALUD PUBLICA SALAMANCA-Fco.Javier Sánchez Hernández, FURFURAL ESPAÑOL-Ana Marín Marín, LAB.MICROKIT-Cristina Aijón Correa y Eva Sánchez Pozuelo, ANAQUA-Málaga-Mónica Martín-Ampudia Ortega, SENOBLE ESPAÑA-Neftali Pinazo, Dr.GOYA ANALISIS-Maria Luisa Güerri Santos, YNSADIET-Juan Ignacio Toribio Sanz, PINISAN-Raúl López García, SAT N° 2439 ALIA-Juan Carlos Segura Ruiz, SCADA-Toñi Puerto Hidalgo y Teresa Suárez Sánchez. Algunos incuban en paralelo ambos métodos a 22°C, otros a 30°C y otros a 35-37°C. La comparación se realiza a las 24, a las 48 y a las 72 h en todos los casos.

Cada laboratorio participante comparó por el sistema de pares, 40-120 muestras naturales de las que analizan rutinariamente. Las MATRICES empleadas fueron: a) ALIMENTOS: Comidas preparadas de múltiples tipos, ensalada de pasta, macarrones con tomate, revuelto de setas, cocido, fabada, lentejas, alubias, huevo crudo entero, yema, clara, mahonesa, tortilla de patatas, tortilla de jamón, huevos con tomate, alioli, sandwich fríos, arroz, paella, salsa, fideuá, pimientos rellenos, ensalada vegetal, gazpacho, puré de verdura, sopa de verdura, crema de verdura, patatas fritas, pastel de verdura, sémola, harina, milhoja de foie, croquetas de jamón, menestra de verduras, patatas en salsa, leche, productos a base de proteína de suero de leche, queso, filetes de pollo, pinchos morunos, canales de vacuno, canales de porcino, canales de ovino, carne de cerdo, carne, cabeza de cerdo, oreja de cerdo, morro de cerdo, carrillada de cerdo, lomo, carne en salsa, salchichas, chorizo, salchichón, magro, conejo frito, pollo guisado, pollo relleno, pescado fresco, pescado congelado, salmón, salmón ahumado, salmón marinado, pulpo, caviar, atún, emperador, calamar, almejas, Fucus, Spirulina, cola de caballo, lino, vainilla, fresa, cacao, chocolate, salvado de trigo, alcachofa, polen, valeriana, berza, extractos cítricos, extractos de hoja de olivo, extractos de echinacea, extracto de Passiflora, anís, anís estrellado, cayena, manzanilla, tomate, cardanomo, pimentón, canela, cuscus, corteza de limón, cebolla, clavo, perejil, pimienta, espliego, hinojo, ajonjolí, orégano, cominos, alholva, te, cúrcuma, nuez moscada, curry, tomillo, colorante alimentario, postres, helados, leche frita, natillas con galleta, flan, miel, jalea real, bollería, repostería dulce, tarta S.Marcos, pan de higo, galletas de higo, magdalenas, zumo de naranja, sal común, azúcar, glucosa, cereales, malta, soja, harina de pescado, levadura, extrusionados, puré de patatas, piensos animales, papillas infantiles, mayonesa, hamburguesa, mortadela, pasteles, jamón; b) AGUAS: agua mineral, agua de mar, agua de mar diluida, agua salobre de piscina por autocloración, agua tratada por ósmosis, agua de torres de refrigeración, aguas de pozo, aguas de piscinas, agua de fuente, agua del grifo, agua de salida de filtro de carbono, aguas residuales; c) COSMÉTICOS: Champú, cacao labial, crema corporal, desodorante, dentífrico, gel de baño tensioactivo aniónico, crema, talco, esmalte de uñas, crema masaje, antiestrías, leche bronceadora, colorete, desodorante, toallitas de bebé, enjuague bucal, tónico facial, sombra de ojos; d) DESINFECTANTES: lavavajillas, fregasuelos.

Hacemos notar que los diferentes tipos disponibles del sistema CompactDryPlates® ya han sido previamente validados por AOAC, Microval, NordVal y SEILA-MICROKIT (consultar bibliografía al final de este certificado). Por ello, aunque en el presente estudio solamente se confirman los datos de dichas validaciones, nuestra intención era ampliar el rango de matrices alimentarias, de aguas y de cosméticos y verificar si en todas funcionan correctamente.


Restricciones de uso: El alcance de la validación incluye todo tipo de matrices alimentarias, acuáticas y cosméticas. Los resultados indican que el agua no puede ser marina ni salobre. También el agua debe estar libre de cloro (inactivar previamente sus residuos mediante tiosulfato Sódico). Algunas matrices lipídicas deben emulsionarse antes (ej:LPT Broth) porque no se autoabsorben en las CompactDryPlates®. En algunos casos concretos (ciertas matrices en ciertos laboratorios, pero no en otros laboratorios) se observan resultados anómalos que contradicen los de la mayoría de laboratorios. De ahí la importancia de que cada laboratorio valide el uso de las CompactDryPlates® en sus propias matrices.

❖ RESULTADOS

En letra azul, los resultados de **CompactDryPlates®-TC** de **MICROKIT®** para recuento de aerobios. En letra negra los resultados del método de referencia.

1. RESULTADOS DE PARAMETROS CUALITATIVOS

En un producto diseñado para recuento total como son las CompactDryPlates®-TC, puede parecer aberrante hablar de parámetros cualitativos de validación. Sin embargo, la cantidad de datos obtenida gracias a este estudio nos permite ser muy creativos a este respecto. No procede hablar de especificidad ya que no puede haber falsos positivos, pero si procede hablar de sensibilidad relativa, que en este caso se equipara con la eficiencia de cada método. En efecto, si comparamos aquellas muestras donde un método ha obtenido colonias y el otro método no, los resultados se podrían denominar SENSIBILIDAD RELATIVA de un método con respecto al otro. E incluso podríamos hablar del LÍMITE INFERIOR DENTRO DEL RANGO DE DETECCIÓN: si comparamos el número de colonias obtenido en un método en las muestras donde el otro método no ha detectado, podremos hablar de un límite inferior de detección de uno respecto al otro:

	SENSIBILIDAD RELATIVA (S) escasez de Falsos Negativos (F-) (muestras en las que hay crecimiento en un método y no lo hay en el otro)		LÍMITE INFERIOR DENTRO DEL RANGO DE DETECCIÓN (Nº colonias detectadas en muestras donde el otro método no detecta)	
	% CompactDryPlates®-TC de MICROKIT®	% MÉTODO DE REFERENCIA	CompactDryPlates®-TC de MICROKIT®	MÉTODO DE REFERENCIA
Muestras sin detección de Aerobios totales	26 F- de 1120: 2,32 % Sensibilidad 97,68 %	ISO 4833 PCA (1) 39 F- de 1120: 3,48 % Sensibilidad 96,52 %	1, 1, 1, 1, 3, 3, 3, 1, 1, 3, 3, 4, 3, 1, 2, 2, 3, 4, 65, 171, 2, 5, 9, 7, 14, 1, 2, 7, 12, 4, 9, 252, 3, 3, 1, 1, 5, 2, 1, 1, 1, 44, 2, 3, 1, 1, 2, 1, 1, 1, 1, 2, 1, 2, 12, 1, 5, 5, 2, 5, 8, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 1, 2, 2, 3, 1, 2, 1, 2, 15, 15, 20, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 2, 1, 2, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 10, 100, 28, 2, 18, 13, 7, 9, 3, 3, 7, 10, 3, 3, 10, 1, 11, 3, 18, 2, 2, 1, 23, 27, 13, 13, 24, 26, 1, 2, 1, 1, 6, 1, 1, 1, 8, 20, 26, 2, 2, 5, 10, 22, 35, 22, 27, 29, 28, 33, 33, 74, 6, 7, 7. (3) En un total de 157 placas (14%) que PCA no detecta nada	420, 10, 30, 30, 30, 29, 36, 36, 2, 1, 1, 2, 1, 1, 1, 3, 5, 3, 1, 122, 87, 98, 5, 34, 38, 16, 29, 34, 20, 30, 37, 24, 38, 40, 37, 38, 38, 52, 59, 66, 37, 45, 46, 33, 102, 198, 1, 1, 2, 3, 4, 1, 1, 41, 1, 1, 1, 57, 57, 90, 80, 10, 10, 30, 110, 10, 7, 3, 1, 100, 300, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 1, 4, 8, 16, 6, 2, 30, 30, 135, 2, 3, 5, 1, 2, 1, 4, 5, 2, 3, 4, 1, 1, 1, 1, 1, 1.: En un total de 103 placas (9,2 %) que CompactDryPlates®-TC no detecta nada (4)
Alerta de rapidez (crecimiento en 24 h)	46 F- de 1120: 4,11 % Sensibilidad 24h: 95,89 %	74 F- de 1120: 6,61 % Sensibilidad 24h: 93,39 % (2)		

(1). Una sensibilidad relativa muy similar y elevadísima en ambos métodos, pero ligeramente mayor en **CompactDryPlates®-TC** que la de los métodos/medios de referencia, demuestran la idoneidad del uso del método propuesto por **MICROKIT®**. Aunque son parámetros eminentemente cuantitativos, la no detección en ellos suele deberse a la siembra en masa con el agar demasiado caliente. Trabajando con los métodos que minimicen este punto crítico (**CompactDryPlates®-TC**), los laboratorios aumentarán su eficiencia.

(2). Observamos que la sensibilidad relativa en los rangos más bajos de detección/cuantificación, durante las primeras 24 h es muy superior en **Compact-Dry-Plates® TC**, lo que nos invita a recomendar también este método para urgencias y para muestras con baja carga microbiana, como son las aguas de consumo humano y los cosméticos.

(3) Se observa que el método **CompactDryPlates®-TC** de **MICROKIT®**, en todos los casos, se acerca más al límite de detección ideal (teórico de 1 ufc/x g) que el método de referencia, de forma estadísticamente muy significativa, unas vez descartadas las matrices invalidadas (aguas salinas).

(4) El método **CompactDryPlates®-TC** incluye un 9,2 % de placas positivas para el método clásico que no detecta, mientras el método clásico incluye un 14% de placas positivas para las

CompactDryPlates®-TC que no detecta. De modo que hay casi un 5% más de muestras positivas detectadas con **CompactDryPlates®-TC** que no son detectadas con el método clásico. Se aprecia que la mayoría de falsos negativos en el método clásico se dan en los valores bajos de recuento, mientras los falsos negativos en las **CompactDryPlates®-TC** ocurren más a menudo en recuentos altos, probablemente por la inexperiencia de los laboratorios en su manejo, ya que en estos casos el medio se colorea homogéneamente de rosa, alertando que debemos repetir el análisis tras aumentar la dilución. La gran mayoría de muestras con detección en PCA y no detección en **CompactDryPlates®-TC** son aguas de mar, de piscinas salobres y de consumo en zonas cercanas al mar ¿salobres?.

Nota: El número de muestras donde no se detectan microorganismos de la derecha de la tabla (157 y 103) no coincide con el de la izquierda (26 y 39), porque para el estudio de límite inferior de detección se han tenido en cuenta todas las lecturas proporcionadas por los laboratorios participantes (a 24, 48 y 72h), a diferencia del estudio de sensibilidad relativa, donde se considera sólo cada grupo de 3 lecturas de cada placa.

Por el momento podemos asegurar que en todos los estudios que hemos realizado hasta ahora sobre validación de métodos alternativos, nunca hemos encontrado tanta similitud en los resultados medios entre el método validado y el método oficial.

2. RESULTADOS DE PARAMETROS CUANTITATIVOS

Dada la ingente cantidad de datos obtenidos en matrices tan dispares, ofrecemos los resultados de Exactitud (recuperación relativa de un método respecto al otro) por cada laboratorio, a fin de intentar sesgar cuáles son las matrices ideales para cada uno de los dos métodos. No tiene sentido realizar un estudio de la precisión del método, al no tener triplicados de las muestras (las 3 lecturas a 24, 48 y 72 h nunca pueden considerarse triplicados), ni por tanto poder estudiarse la dispersión de resultados por cada muestra. Además, en el tema de precisión, gran parte de la imprecisión detectada se suele deber al componente analista y al componente inter-laboratorio, más que al componente medio de cultivo o a su formato. Sin embargo, mediremos de otra manera la dispersión de resultados: mediante el % de muestras en cada laboratorio que obtienen mejor resultado con un método o con el otro. Los datos que hemos encontrado como más estables en ambos métodos son los obtenidos tras 48 horas de incubación, que son los que se reflejan en la siguiente tabla. Los datos a 24 horas son mucho más favorables para las **CompactDryPlates®-TC**, y los datos a las 72 horas no difieren significativamente de los datos a las 48 horas.

En las matrices donde un método detectaba con 1 ó más colonias y en el otro método no crecía ninguna, no hemos querido desperdiciar los resultados calificándolos de aberrantes; por ello hemos realizado una corrección, asignando una colonia a las placas con 0 colonias en las muestras en que el otro método detectaba más de 1 colonia, a fin de que esas muestras pudiesen entrar en el estudio cuantitativo de recuperación relativa.



LABORATORIOS Y MATRICES

	<p>EXACTITUD (medida por recuperación relativa de un método frente al otro: cercanía de los recuentos al valor patrón, que de acuerdo con la ausencia de generación espontánea de Pasteur, debe considerarse siempre el recuento más alto de los dos)</p> <p>Y DISPERSIÓN (medida por proporción de muestras con mejores resultados en CompactDryPlates®-TC)</p>
	% RECUPERACIÓN RELATIVA CompactDryPlates®-TC de MICROKIT® respecto al MÉTODO DE REFERENCIA
Resultados previos (intercomparativos SEILA)	141,00 % respecto a medios clásicos
Lab 1: COSMÉTICOS VARIADOS	106,81 % respecto a TSA, 53%
Lab 2: ALIMENTOS VARIADOS	117,56 % respecto a PCA-Cromogénico, 87,5%
Lab 3: AGUA DE MAR Y MINERAL	8,07% respecto a TSA (1), 0%
Lab 4: CANALES VACUNO	88,17 % respecto a PCA-Cromogénico (2), 25%
Lab 5: AGUA OSMOTIZADA	205,71 % respecto a TSA, 77,5%
Lab 6: PLANTAS Y PROTEINA DE LECHE	132,53 % respecto a LPT Neutralizing Agar (3), 45%
Lab 7: ALIMENTOS VARIADOS	113,45 % respecto a PCA (4), 80%
Lab 8: LECHE	144,25 % respecto a petrifilm (5), 57,5%
Lab 9: ALIMENTOS Y AGUAS VARIOS	134,84 % respecto a PCA, 70,3%
Lab 10: HUEVO, YEMA Y CLARA	180,40 % respecto a PCA, 53,3%
Lab 11: AGUA fuente, red, envasada, marina y de piscina salada	194,87%, 101,87%, 109,37%, 68,25% y 0% respectivamente, ante PCA, 100, 50, 50, 0 y 0%
Lab 12: EXTRACTOS VEGETALES	79,27 % respecto a PCA (6), 27,5%
Lab 13: AGUAS BAÑO, BEBIDA Y ALIMENTOS	190,77 % respecto a PCA, 100%
Lab 14: AGUAS MINERALES	215,42 % respecto a TSA (7), 95%
Lab 15: GEL DE BAÑO ANIONICO	¿¿¿??? sólo obtiene 3 recuentos comparativos ante un agar que no indica cuál es, 67%
Lab 16: OVOPRODUCTOS	83,85 % respecto a PCA (8), 30%
Lab 17: MIEL, POLEN, JALEA REAL, BOLLERÍA	172,54 % respecto a PCA (9), 50%
Lab 18: ALIMENTOS VARIADOS	97,10 % respecto a PCA, 37,5%
Lab 19: ALIMENTOS Y AGUAS VARIOS	259 % respecto a PCA (alim) y YEA (aguas), 95%
Lab 20: COSMÉTICOS VARIADOS	184,83 % respecto a LPT Neutralizing Agar, 90%
Lab 21: ESPECIAS Y PIMENTÓN	183,24 % respecto a PCA, 79,41%
Lab 22: AGUAS DE PISCINAS	105,27 % respecto a PCA, 85%
Lab 23: ALIMENTOS, CANALES Y AGUAS VARIOS	69,85 % respecto a PCA (10), 30%
Lab 24: ALIMENTOS Y AGUAS VARIOS	71% % respecto a PCA (11), 16%
Lab 25: AGUAS VARIAS	198 % respecto a agar no indicado, 65,4%
TOTAL:	129,56 % y 55,76 %
TOTAL tras eliminar las matrices invalidadas por obtener menos del 90% de recuperación relativa y que los laboratorios ya saben que no deben usar con CompactDryPlates®-TC (aguas salinas y salobres, extractos grasos):	162,78 % y 70,88 %

En conjunto, el método clásico de referencia RESULTA significativamente menos exacto que las Compact-Dry-Plates® TC de MICROKIT®, probablemente porque el primero facilita la confusión de colonias con partículas y porque la siembra en masa en agar caliente convierte buena parte de los microorganismos presentes en la muestra en inviables durante su análisis. Especial atención deben poner los laboratorios cuyo recuento medio en CompactDryPlates®-TC es superior al 170 % del obtenido por inclusión en masa por la técnica tradicional, ya que puede ser un indicador de alerta de que no enfrían suficientemente el medio clásico al añadirlo a la muestra (punto crítico que se ahorrarán usando de rutina las CompactDryPlates®-TC). Sin embargo hay que dar por invalidadas las CompactDryPlates®-TC para unas matrices muy concretas: Aguas saladas, salobres y extractos grasos. El caso de las canales de vacuno y los ovoproductos habría que re-estudiarlos, ya que otros participantes los analizan entre otras múltiples matrices con excelentes resultados comparativos también en ellas para las CompactDryPlates®-TC.

- (1) Sin duda el agua salada interfiere negativamente. Muchas piscinas emplean cloradores salinos y también salen mal paradas si se analizan con CompactDryPlates®-TC.
- (2) El laboratorio disuelve la canal directamente en Maximum Recovery Diluent. Si emulsionara las grasas con LPT Neutralizing Broth es probable que los resultados con CompactDryPlates®-TC mejorasen sustancialmente (le invitamos a probarlo así).
- (3) Aunque la media general favorece a las CompactDryPlates®-TC en este laboratorio, hay más muestras (55%) con resultados más favorables al medio clásico que favorables a las CompactDryPlates®-TC (45%). Hay mucha variación entre unas matrices y otras, en muchas las CompactDryPlates®-TC obtienen recuperaciones de hasta un 960 % y en otras muchas de sólo el 0,2 %. Este laboratorio ha de extremar su cuidado porque cuenta con muestras extraordinariamente diversas. Probablemente, al tratarse muchos de ellos de productos grasos, usando LPT Neutralizing Broth en lugar de Agua Peptonada Tamponada los resultados serían mucho más homogéneos, menos dispares y más cercanos al 100% tanto en CompactDryPlates®-TC como en el medio clásico (le invitamos a probarlo así).
- (4) A la inversa que el laboratorio anterior, los resultados son muy homogéneos a pesar de la gran variedad de matrices diferentes que analiza, obteniendo un 80% de placas con mayor recuento en CompactDryPlates®-TC que en el medio clásico. Este laboratorio sí utiliza LPT Neutralizing Broth como diluyente
- (5) Los resultados en este laboratorio son menos homogéneos, con sólo un 57,5% de placas cuyo recuento es mayor en CompactDryPlates®-TC. Sin embargo en ellas las diferencias con el recuento en Petrifilm son muy significativas, lo que redundaría en esa recuperación relativa media tan diferente.
- (6) El laboratorio comenta que sus productos son insolubles en agua de peptona y que a mitad de estudio cambiaron a LPT Neutralizing Broth para emulsionar las grasas y permitir que la muestra se autodispersara en la CompactDryPlates®-TC. También indica que no le gusta haber obtenido estos resultados en los que el método tradicional resulta más sensible en sus matrices, aunque hemos de decirle que ese es el valor de una validación con SUS muestras.
- (7) Este laboratorio filtra 250 ml y deposita la membrana sobre TSA, pero no indica si el recuento en CompactDryPlates®-TC lo realiza de igual manera (prehidratando la plaquita con 1 ml de agua estéril) o si por el contrario siembra 1 ml de agua directamente. En cualquier caso, nótese la espectacular recuperación comparativa en CompactDryPlates®-TC, y en este caso no es debida a la fusión de agares para siembra en masa.
- (8) Los resultados en este laboratorio son anómalos, con muestras poco favorables para las CompactDryPlates®-TC, y además en muchos casos. No es causa de la matriz, ya que el laboratorio 10 analiza también huevo y obtiene resultados muy favorables para las CompactDryPlates®-TC. La diferencia más evidente es que el Lab.16 diluye en Agua de Peptona y el Lab.10 en LPT Neutralizing Broth y ayuda a la autoabsorción con asa de Digrafsky para la muestra madre sin diluir.
- (9) En este laboratorio contrastan unos resultados muy desfavorables para las CompactDryPlates®-TC en algunas muestras, con otros muy favorables, se encuentra una alta dispersión de resultados, aunque la media resulta favorable para las CompactDryPlates®-TC.
- (10) y (11) Estos dos laboratorios no obtienen buenos resultados para las CompactDryPlates®-TC, aunque curiosamente usan el mismo tipo de matrices que otros cinco laboratorios que obtienen resultados magníficos con las CompactDryPlates®-TC: 2, 7, 9, 13 y 19.

En general observamos dos tipos de resultados aberrantes:

1-Varios laboratorios obtienen muy malos resultados con las CompactDryPlates®-TC y de repente en las siguientes muestras los resultados son excelentes para las mismas. Como si hubieran cambiado la técnica, al observar que empleaban formas de sembrar erróneas, o como si hubieran cambiado el operario, pero ningún laboratorio indica nada que nos lo aclare.

2-Un mismo tipo de matriz obtiene resultados excelentes para las CompactDryPlates®-TC en unos laboratorios y nefastos en otros laboratorios, sin llegar a entender cuál es el motivo de esta disparidad de resultados. Se nos apunta que puede ser porque algunos usan medios comparativos de mayor calidad que otros, pero tan abismales diferencias, capaces de girar la balanza a uno u otro sentido sobre la conveniencia de uso de las CompactDryPlates®-TC en dichas matrices, no pueden deberse a las calidades de los medios del mercado, que siempre rondan para el recuento total unas recuperaciones relativas medias del 90%. Creemos más bien que se debe a la mayor destreza de algunos analistas a la hora de verter el agar a una temperatura adecuada que no "queme" los microorganismos; para esos laboratorios evidentemente la recuperación relativa de las CompactDryPlates®-TC, no es tan enorme como para los demás.

❖ COMENTARIOS DE LOS LABORATORIOS PARTICIPANTES SEGÚN LAS MATRICES ANALIZADAS

En nuestras canales de vacuno, en placa de PCA podemos contar entre 15 y 300 colonias, mientras en Compact-Dry-Plates® el rango máximo es de 200 colonias por placa. A partir de aproximadamente 250 ufc/placa es prácticamente imposible contar: Nota del coordinador: El rango ideal de las Compact-Dry-Plates® es de 10-200 ufc/placa. Para los recuentos altos, están divididas en cuadrados de 1 cm², a fin de permitir realizar el recuento en sólo 1 cuadrado y multiplicar por 20, ahorrando tiempo al analista.

En nuestros cosméticos los recuentos son semejantes en ambos métodos, aunque a niveles altos parecen crecer más en las Compact-Dry-Plates® que en la placa clásica.

En nuestras aguas tratadas por ósmosis hay mayor detección de colonias en concentraciones bajas con las Compact-Dry-Plates® que con TSA.

En general en nuestros productos a base de plantas y de proteína de suero de leche, obtenemos un resultado menor en las Compact-Dry-Plates® que en LPT Agar.

En nuestras canales en la mayoría de muestras hemos obtenido un resultado similar con ambos métodos entre las 48 y 72 h de incubación a 37°C, pero a las 24 h preferimos el PCA.

En todo tipo de alimentos analizados a 30 °C con PCA, ambos métodos muestran resultados similares, siendo más sensibles las Compact-Dry-Plates®.

En agua de mar y en agua mineral todas las colonias aparecidas eran rojas, no había cepas con colonias crema típicas del TSA.

El ahorro de tiempo en la preparación de medios supone una mejora significativa a favor del uso de Compact-Dry-Plates®.

En algunas aguas el recuento es complicado porque muchas colonias crecen pequeñas y con escaso color rojo.

La yema de huevo no se autodifunde y hay que usar un asa de Digrafsky para dispersarla.

En aguas de baño y de grifo donde no inactivamos el cloro los recuentos son muy inferiores en Compact-Dry-Plates®. Sin embargo, tras repetir la comparativa usando Tiosulfato Sódico antes de la siembra, los resultados son iguales que en PCA. Nota del coordinador: Aunque el Agar-Agar tiene una elevada capacidad tampón y neutralizante, todos sabemos que es incorrecto analizar aguas cloradas sin haberles neutralizado previamente el cloro con Tiosulfato Sódico.

Como la mayoría de nuestros productos son insolubles en agua (extractos vegetales), no autodifundían en la Compact-Dry-Plates®. Quedó resuelto usando como diluyente LPT Broth. En algunas muestras como pasiflora, el medio de las Compact-Dry-Plates® se queda muy oscuro, lo que dificulta el recuento. En general en nuestros productos los resultados en PCA son más sensibles que en Compact-Dry-Plates®.

En queso pasado por stomacher, el conglomerado hizo ilegibles los resultados en Compact-Dry-Plates®. Sin embargo en prácticamente todas las muestras de platos preparados, aguas de consumo humano y aguas de baño, obtenemos mayor recuperación en Compact-Dry-Plates® que en el método tradicional con PCA. El método ahorra mucho tiempo de elaboración de medios y elimina errores de manipulación. Nos parece fundamental que suponga la eliminación de un paso crítico como es el fundir el medio y esperar a que se atempere para añadirlo a la placa con muestra, ya que así con las Compact-Dry-Plates® no hay posibilidad de eliminar microorganismos por haber añadido el medio a temperaturas excesivas. Destaca también la fácil

visualización por el cambio de color de las colonias. En resumen me parece un método magnífico por su sencillez, fácil manejo y recuperación de microorganismos.

En recuentos bajos en agua, las Compact-Dry-Plates ® obtienen resultados más rápidos y recuentos más altos.

El método de las Compact-Dry-Plates ® en miel, polen, jalea real y bollería es más rápido y se ven mejor las colonias que en PCA. En muestras con escaso recuento van mejor las Compact-Dry-Plates ®, pero si el recuento es alto se lee mejor la placa clásica de PCA

En nuestras comidas preparadas no se veían muy claras las colonias.

En alimentos y aguas es un método rápido, fácil de leer, más sensible que los métodos clásicos. El recuento es mejor a los 2-3 días, tras 4 días se generan colonias incoloras. La única pega es que su menor tamaño dificulta el recuento. Se elimina la posibilidad de "quemar bacterias". No hace falta homogeneizar la muestra con el medio, con lo que nos ahorramos vertidos accidentales. Aparecen colonias rojas pero también algunas amarillas o blancas, sin encontrar una correlación entre el color de las colonias y el tipo de muestra.

En nuestros cosméticos, el aislamiento de las colonias en la Compact-Dry-Plates ® permite un conteo más fiable que en LPT Agar, por su perfecto aislamiento en la placa sin producirse invasiones.

En nuestras especias y pimentón, las Compact-Dry-Plates ® son perfectas para cuando se hacen los análisis con siembras en masa y además muy cómodas. Por otra parte, comparando la siembra en PCA en masa con la siembra en PCA en superficie, los resultados son mejores en masa y más similares a los obtenidos con Compact-Dry-Plates ®. Nota del coordinador: La siembra en recuento total de aerobios es obligada en masa, precisamente porque obtiene mejores resultados al estar cada ufc rodeada de medio y evitarse los "spreadings" que impiden leer colonias lentas cercanas a las invasivas que las engloban. Algo similar a lo que ocurre en el recuento de hongos al emplear Rosa Bengala Caf. Agar en vez de medios clásicos para hongos.

En aguas de piscina y potables y en alimentos obtengo un 61% de recuperación en Compact-Dry-Plates ® con respecto al recuento en PCA. Nota del coordinador: Por más vueltas que le dimos conjuntamente, no encontramos una explicación coherente para comprender cómo encajan estos resultados entre los de la mayoría de laboratorios para estos tipos de matrices, donde los recuentos con Compact-Dry-Plates ® son similares, si no mayores, a los del PCA.

En todo tipo de aguas el recuento con Compact-Dry-Plates ® es mucho más exacto y mucho mejor visible que en la placa tradicional. Nota de coordinador: Este laboratorio usó muchos tipos de aguas, pero no marinas ni de piscinas salobres, en las cuales los recuentos en Compact-Dry-Plates ® se ven muy inhibidos.

Como vemos hay para todos los gustos, incluso en matrices idénticas hay opiniones contradictorias entre unos y otros usuarios. Hemos marcado con letra negra los comentarios desfavorables hacia las Compact-Dry-Plates ® y en azul los que les son favorables. Se observa que definitivamente la media global prefiere el uso de las Compact-Dry-Plates ® cuando han tenido la oportunidad de utilizar comparativamente ambos métodos.

❖ CONCLUSIONES

1-En general y salvo excepciones en algunas matrices (aguas saladas o salobres y extractos grasos) y/o laboratorios, Las Compact-Dry-Plates®-TC igualan o incluso MEJORAN los resultados analíticos de los métodos clásicos de referencia para recuento total de aerobios. Las Compact-Dry-Plates®-TC maximizan la sensibilidad relativa (1,15% mayor en 48 horas y 2,5% mayor en 24 horas) y la exactitud (141% de recuperación relativa en intercomparativos SEILA, 130% en este estudio y 163% eliminando las matrices invalidadas). Creemos que hay dos motivos: el ahorro del punto crítico de la siembra en masa por refusión de agares, que en el método clásico, a menudo convierte en inviables, por exceso de calor, a los microorganismos diana; y la confusión de colonias con partículas de alimento en el método clásico. Quedan VALIDADAS las Compact-Dry-Plates® TC (excepto para aguas saladas, salobres y extractos grasos), que con sus datos de validación demuestran ser, no sólo la forma más cómoda y práctica de trabajar en microbiología, sino además la más fiable. Además, lo hacen como mínimo, tan bien como el método de referencia, demostrando una superior sensibilidad relativa, una mayor frecuencia de detecciones en límites de detección mínimos, así como una mayor exactitud y economía que el método de referencia, en su implantación en los distintos laboratorios que los aplican. La mayor facilidad de uso de este método permite realizar muchas más muestras en menos tiempo, a la vez que se disminuye el número de puntos críticos del análisis y por tanto se aumenta su robustez incluso para usuarios poco acostumbrados a su manejo o a las técnicas microbiológicas.

2- El método CompactDryPlates®-TC incluye un 9,2 % de placas positivas para el método clásico que no detecta, mientras el método clásico incluye un 14% de placas positivas para las CompactDryPlates®-TC que no detecta. De modo que hay casi un 5% más de muestras positivas detectadas con CompactDryPlates®-TC que no son detectadas con el método clásico. Se aprecia que la mayoría de falsos negativos en el método clásico se dan en los valores bajos de recuento, mientras los falsos negativos en las CompactDryPlates®-TC ocurren más a menudo en recuentos altos, probablemente por la inexperiencia de los laboratorios en su manejo, ya que en estos casos el medio se colorea homogéneamente de rosa, alertando que debemos repetir el análisis tras aumentar la dilución. La gran mayoría de muestras con detección en PCA y no detección en CompactDryPlates®-TC son aguas de mar, de piscinas salobres y de consumo en zonas cercanas al mar ¿salobres?. La escasez de falsos negativos o máxima sensibilidad relativa, sobre todo en recuentos bajos (aguas minerales y de consumo, cosméticos...), aconseja utilizar en estas matrices el método Compact-Dry-Plates® TC de MICROKIT®.

3- Observamos además que la sensibilidad relativa en los rangos más bajos de detección/cuantificación, durante las primeras 24 h es muy superior en Compact-Dry-Plates® TC, lo que nos invita a recomendar también este método para obtener resultados de screening negativo en urgencias y para muestras con baja carga microbiana, como son las aguas de consumo humano y los cosméticos.

4- Confiamos que todo este trabajo, fruto de un tremendo esfuerzo conjunto en 2 años por parte de numerosos laboratorios de toda España, sea bien aceptado por las entidades de acreditación, normalización e inspección. Todo ello en aras a una mejora de la calidad analítica y del menor coste y derroche para los laboratorios y el medio ambiente que estos métodos implican. Ello incentivará que desde esta empresa podamos seguir diseñando en España métodos más eficientes para otros parámetros microbiológicos y evitará que los laboratorios acreditados ISO 17025 y los autorizados por Sanidad, se estanquen en métodos clásicos que hemos demostrado cómo son no sólo igualables en calidad, sino incluso optimizables, gracias a un concepto que nunca debe olvidarse en ningún laboratorio: la mejora continua sin trabas burocráticas que la limiten.

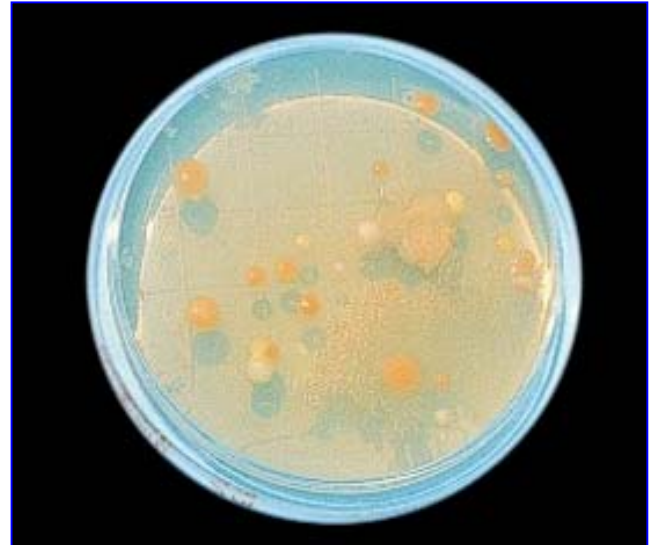
5-Esperamos también que los laboratorios sepan aprovechar todas estas conclusiones para implementar, si no los utilizan ya, los métodos más eficientes. No sólo obtendrán resultados

más fiables, además ahorrarán tiempo mediante técnicas más avanzadas y selectivas, así como dinero al ahorrar muchas de las manipulaciones que ahora les resultan necesarias y luego no lo serán. Les recordamos que estas conclusiones de validación se pueden aplicar exclusivamente a los kits indicados de la marca MICROKIT®, ya que usando otras marcas tendrán que revalidarlo todo, porque nadie puede asegurar que vayan a comportarse de igual modo. MICROKIT ® y Compact-Dry-Plates ® son marcas registradas en España y otros países, propiedad de Laboratorios MICROKIT, S.L. Todo proveedor que le ofrezca estos productos sin ser distribuidor oficial de Laboratorios MICROKIT, S.L. comete un delito por apropiación indebida y por uso ilícito de marcas, que debe ser dado a conocer urgentemente al propietario de la marca por el laboratorio que lo detecte. ¡Es fácil comprender que no trabajamos para nuestros competidores, sólo solicitamos su apoyo en algo moral y legalmente correcto!

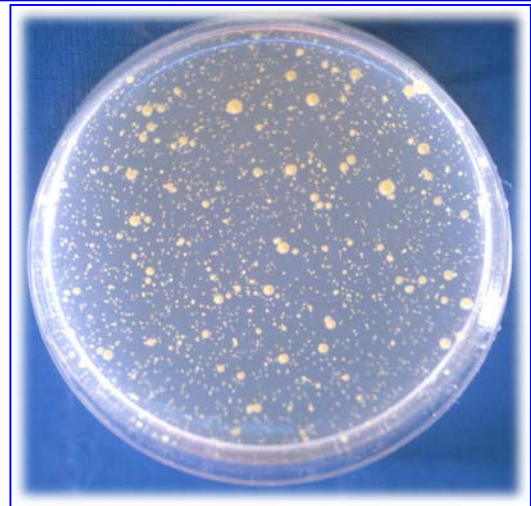
❖ ANEXO FOTOGRÁFICO



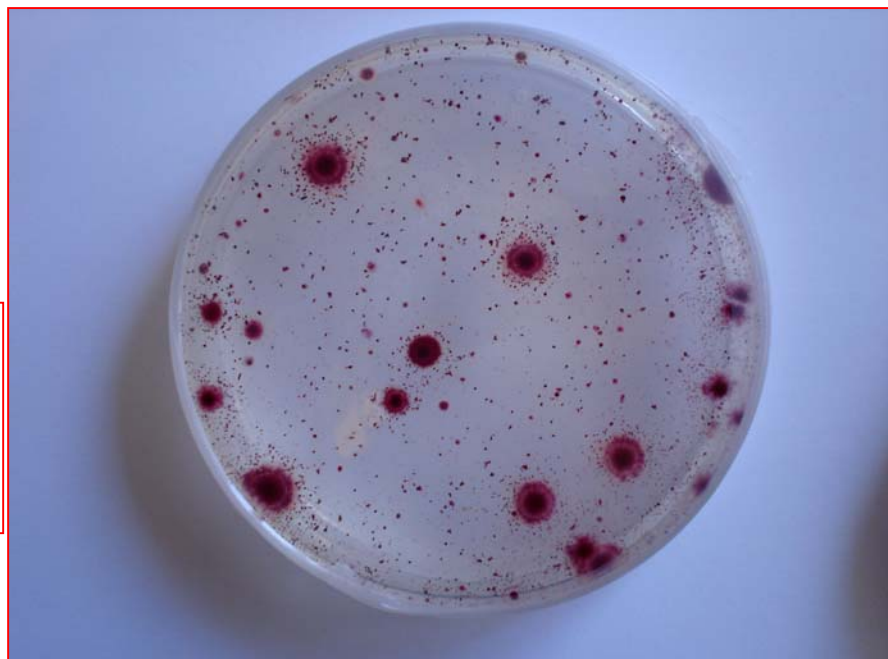
ARRIBA: Compact-Dry-Plates® TC: Máxima comodidad de uso, autosiembra en masa de 1 ml y disminución de puntos críticos, sobre todo la fusión y adición de agares demasiado calientes, que pueden impedir el crecimiento y detección de buena parte de la flora aerobia. Las colonias rojas no se confunden con partículas de muestra u otros artefactos.



ARRIBA y ABAJO: Medios clásicos (PCA, YEA, LPTA, TSA...): Las colonias crema no contrastan bien con el medio, desgastando la vista del analista; además, las colonias diminutas a menudo se confunden con partículas de muestra.



DERECHA: PCA-Cromogénico MICROKIT®: las colonias rojas contrastan mejor con el medio y las partículas de la muestra, sobre todo en el caso de las colonias diminutas, que pasarían desapercibidas en PCA clásico.



❖ 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.
- ✚ UNE-EN ISO 4833. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30 °C.
- ✚ Informes SEILALIMENTOS 1 a 42 (total 1.700 páginas), Laboratorios MICROKIT, Marzo-1999 a Junio-2009
- ✚ PRT-SEILA-001: Protocolo GLOBAL **VALIDADO** para la ejecución correcta de análisis de alimentos (e intercomparativos SEILALIMENTOS) (42 páginas)
- ✚ PNT-AL-003: Alimentos: Recuento de microorganismos a 30 °C (50 páginas)
- ✚ PRT-VAL-001 Protocolo para VALIDACIÓN en microbiología (69 páginas)
- ✚ PRT-VAL-1+2, Idem, incluido CD con hojas de cálculo en Excel.
- ✚ Informes múltiples de validación AOAC, Microval y NordVal sobre las CompactDryPlates® disponibles en Laboratorios Microkit, S.L.
- ✚ REAL DECRETO 1074/2002 de 18 de Octubre sobre aguas de bebida envasadas. BOE 29.10.2002
- ✚ REAL DECRETO 140/2003 de 7 de Febrero sobre Calidad de Aguas de Consumo Humano. BOE 21.02.2003
- ✚ REAL DECRETO 865/2003 de 4 de Julio sobre prevención y control de la Legionelosis. BOE 18.07.2003
- ✚ Norma ISO 6222. Calidad del agua. Enumeración de microorganismos cultivables. Recuento de colonias por siembra en medio de cultivo de agar nutritivo (YEA).
- ✚ Informes SEILAGUA® 1 a 30 (Total: 1.110 páginas), Laboratorios MICROKIT, Abril-2002 a Julio-2009
- ✚ PRT-SEILA-002, Protocolo GLOBAL VALIDADO para la ejecución correcta de análisis de aguas (e intercomparativos SEILAGUA®) (39 páginas)
- ✚ 12/2007: PROTOCOLOS MICROKIT VALIDADOS PARA ANALISIS DE COSMÉTICOS. Protocolos MICROKIT para control microbiológico de cosméticos, VALIDADOS mediante 3 años de ensayos intercomparativos SEILAPARFUM. Tecnicas de Laboratorio 331, Mayo 2008.
- ✚ 06/2008: PROTOCOLOS MICROKIT VALIDADOS PARA ANALISIS DE AGUAS. Protocolos MICROKIT para control microbiológico de aguas, VALIDADOS mediante 6 años de ensayos intercomparativos SEILAGUA®. Tecnicas de Laboratorio 332, 6/2008. VII Reunión Micro acuática. Bilbao 9/2008.
- ✚ 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.
- ✚ 01/2009: AOAC Certificate of Performance Tested Status N° 010404 of Compact-Dry-Plates ®-TC
- ✚ 03/2007: MICROVAL Certificate of Compliance Lloyd's Register Quality Assurance of Compact-Dry-Plates ®-TC under EN ISO 16140:2003
- ✚ 12/2008: NORDVAL Certificate of Validation of Compact-Dry-Plates ®-TC with ISO 4833:2003 under ISO 16140:2003
- ✚ 03-2009: VALIDACION MICROBIOLOGÍA COSMÉTICA. Validación de análisis de cosméticos y esquema de trabajo. 9 pp. MICROKIT © 31-Marzo-2009
- ✚ 07-2009: VALIDACION MICROBIOLOGÍA DE AGUAS. Validación de análisis de aguas. 11 pp. MICROKIT © 09-Julio-2009
- ✚ 03-2009: VALIDACION MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS. Validación de análisis de alimentos y esquema de trabajo. 12 pp. MICROKIT © 16-Julio-2009