

Conclusiones sobre la validación de los protocolos Microkit optimizados para análisis microbiológico de alimentos frente a la normativa relacionada mediante los ensayos intercomparativos Seilalimentos

Jorge Sanchis Solera*, Eva M^a Sánchez Pozuelo*, Natalia Rook González, Sylvia Ajates Rodríguez*, Antonio de la Llana Martín.

*Laboratorios Microkit, S.L.

Introducción y objetivos

A la vista de los resultados analíticos de numerosos laboratorios de análisis de alimentos que nos han confiado nuestras asesorías microbiológicas y han trabajado con el apoyo de nuestros servicios intercomparativos en los últimos años, y en aras de una mejora de la metodología tradicional, hemos realizado una optimización de los protocolos tradicionales para análisis microbiológico de alimentos que se basan en las diversas Normas ISO y libros del Ministerio de Sanidad mencionados en bibliografía, así como en las Normas microbiológicas de alimentos recopiladas en la misma.

Dicha optimización, basada en los mejores resultados obtenidos por los laboratorios que aplican las diversas mejoras que allí se contemplan, está resumida en las 42 páginas del "Protocolo Global validado para la ejecución correcta de análisis de alimentos (e intercomparativos Seilalimentos)". Sin embargo, el desarrollo completo del tema se puede estudiar mucho más profundamente en los diversos protocolos de título similar que hemos desarrollado, uno para cada parámetro microbiológico concreto y otro para ambientes y operarios en industrias alimentarias (de 17-61 páginas cada uno y que están indicados en el capítulo de bibliografía).

La presente publicación pretende terminar con un punto crítico metodológico fundamental que hemos detectado en el comienzo de todos los métodos microbiológicos de análisis de alimentos (la capacidad más o menos estimuladora según el caldo de revitalización/solución madre utilizado), así como con otros

puntos conflictivos más específicos para los distintos parámetros. Estamos convencidos de que los laboratorios comprometidos con la calidad agradecerán nuestros esfuerzos y aplicarán estas mejoras con todo rigor, en aras de la detección de los eventuales problemas microbiológicos que pudieren surgir en el futuro en sus alimentos, evitando así las sanciones administrativas que algunos de ellos ya han sufrido.

Nuestro objetivo es ir mucho más allá y que los protocolos Microkit, así como la presente publicación, puedan servir de método de referencia en microbiología alimentaria para todo laboratorio que desee utilizar los procedimientos que se han demostrado más sensibles (escasez de falsos negativos) y específicos (escasez de falsos positivos) y por tanto más eficaces (eficientes) y robustos, aunque no siempre coincidan exactamente, ni en todas las partes, con los métodos indicados en la Normativa actual.

Este es el máximo valor que se le puede pedir a una validación de métodos estimulada por un servicio intercomparativo. Confiamos que todas las entidades implicadas en la calidad analítica sabrán apreciar nuestro trabajo.

Material y métodos

El presente estudio pretende demostrar si la aplicación estricta de estos nuevos protocolos Microkit redundará en una impresionante mejora de resultados analíticos para el laboratorio de análisis de alimentos, como los autores defienden.

Para ello, hemos ido comparando los resultados de los laboratorios participantes en el servicio intercomparativo microbiológico de muestras de alimentos, Seilalimentos, desde la creación de éste en marzo de 1999, con los resultados de nuestro laboratorio piloto de control de calidad (donde las personas que aparecen tras el autor principal, coordinador del servicio, utilizaban dichos protocolos al pie de la letra, desconociendo siempre cuál era el inóculo, elaborado en cada servicio y guardado en estricta confidencialidad por el autor principal).

Los métodos de contraste han sido los Reales Decretos y Normas ISO/UNE sobre alimentos indicados en bibliografía, en que se basaban todos los laboratorios participantes que no utilizaban el protocolo Microkit y en el que se siguen basando todos los laboratorios de España que todavía no han implantado nuestros consejos y conclusiones, que por eso publicamos aquí.

También hemos estudiado la intracomparación de los usuarios repetitivos del servicio, y cómo iba evolucionando la mejora de sus resultados al ir implementando los consejos que siempre plasmamos en los informes de Seilalimentos.

De este modo, hemos trabajado comparativamente durante 10 años de servicios intercomparativos Seilalimentos, con 35 servicios (y sendas matrices) y un total de 730 muestras con 14 parámetros cada una, analizadas entre un total de 100 laboratorios participantes de toda España que, por obvios motivos de confidencialidad, no pueden ser revelados. Aunque los informes completos que demuestran todos los resultados y conclusiones sólo han estado disponibles para estos 100 participantes de Seilalimentos, ellos también leerán esta publicación, de modo que nadie puede pensar que los datos puedan estar manipulados a conveniencia de los productos Microkit.

Las matrices utilizadas han sido siempre variadas y ocupan la gama completa de alimentos: carne en polvo, leche (fresca y en polvo), huevos, especias (pimentón), sal común (NaCl), salchichas, azúcar (glucosa), cereales (malta, soja, harina de trigo), harina de pescado, galletas, pasta, levadura, extrudidos, puré de patatas, piensos animales, papillas infantiles, pescado, zumo de naranja, mayonesa, crema de cacao, hamburguesa, arroz precocinado, pollo, queso, ensalada vegetal, mejillones, pasteles, ket-chup, infusión de hierbas, helados, embutidos y horchata.

Resultados

Los resultados de 35 informes Seilalimentos ocuparían más de mil páginas, por lo que nos limitamos a exponer aquí el resumen de resultados y alguna tabla de ejemplo extraída de diferentes informes Seilalimentos.

En esta publicación preferimos abundar en las conclusiones (nada menos que 24, todas ellas de la máxima trascendencia).

Clave del laboratorio	Calificación del rendimiento	Clave del laboratorio	Calificación del rendimiento
2686	7,1	1111	8,2
5495	10	8689	6,4
1367	6,4	3932	8,9
2850	8,9	R76M	9,3
M034	6,1	4811	2,5
R692	5,3	5026	7,1
1641	10	1895	8,6
B537	6,8	1677	8,9
1714	7,1	3239	6,2
Media		7,43	
Desviación estándar		1,88	

Tabla 1. Ejemplo de calificaciones obtenidas por los laboratorios participantes en Seilalimentos 23°, de septiembre de 2004. La calificación es el resultado de restar de 10 un punto por cada error analítico. Marcamos en rojo el 33% de resultados pobres (<7/10). En azul, los dos laboratorios con puntuación inmejorable.

Clave del laboratorio	Calificación del rendimiento	Clave del laboratorio	Calificación del rendimiento
0001	8,75	D994	7,2
460-	7,7	F03M	9,2
5338	10	FM72	5,5
8888	9,1	F310	8,6
D164	10	F74A	8,4
D532	7,8	F827	3,7
D911	10	HM55	7,8
Media		8,21	
Desviación estándar		1,8	

Tabla 2. Evolución de la mejora de los resultados de los laboratorios participantes en Seilalimentos 36°, de Diciembre de 2007. Obsérvese que los resultados pobres (<7/10) bajan a un 14%. En azul, los 3 laboratorios con puntuación inmejorable.

La validación del método Microkit para control microbiológico de alimentos obtiene los siguientes resultados:

En la exactitud y la precisión de los parámetros cuantitativos (*Bacillus cereus*, *E. coli* general, Coliformes, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium Perfringens*, *Staphylococcus Aureus* coagulasa positivo, hongos (levaduras y mohos), aerobios mesófilos y Enterobacterias), no ha habido diferencias significativas entre los diferentes métodos, ya que no se detectan, mediante la herramienta de las z-scores, datos aberrantes en ninguno de los métodos ni medios. Lo que demuestra la ineficacia de esta herramienta estadística para este tipo de estudios, al haber sido el

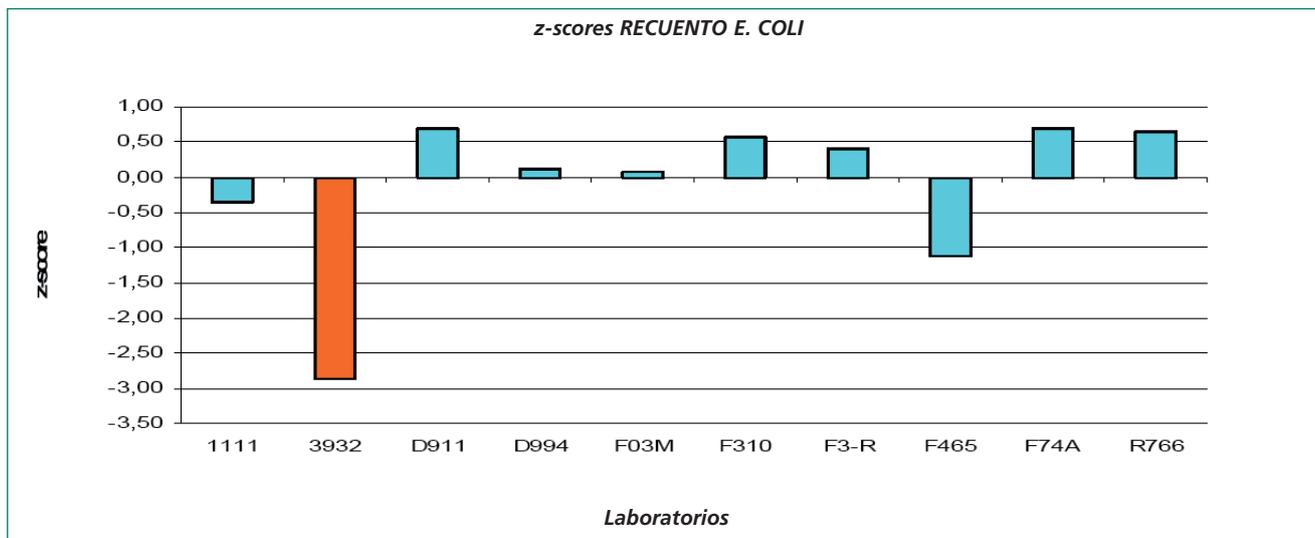


Tabla 3. Ejemplo de resultados cuantitativos intercomparados con z-scores (todos correctos al estar dentro de ± 2 y uno dudoso). Informe 31°, septiembre de 2006.

recuento de *Cl. Perfringens*, Hongos –levaduras y mohos– y Enterobacterias, sobre todo, realmente conflictivos.

Sin embargo, en cuanto a la detección cualitativa de microorganismos, la sensibilidad, especificidad y eficacia demostradas en todos los parámetros comparados (*Salmonella/Shigella*, *Bacillus cereus*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* general, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium Perfringens*, *Staphylococcus Aureus* coagulasa positivo, *Staphylococcus spp.* coagulasa negativos, *Vibrio Parahaemolyticus*, *Campylobacter Jejuni*, hongos (levaduras y mohos) y Enterobacterias) para el protocolo Microkit ha sido de un impresionante 100% en todos los parámetros, ya que no ha habido ni un solo falso positivo ni un solo falso negativo utilizando estrictamente el protocolo Microkit comparado con las cepas inoculadas y con las cepas no inoculadas en todas las muestras.

Por el contrario, los métodos que se consideran de referencia, han supuesto, como media, una eficacia del 70,90%, lo que corresponde a un total de falsos positivos + falsos negativos del 29,1% (casi 1 fallo de cada 3 análisis realizado con dichos métodos), algo preocupante en la España del siglo XXI.

Los alimentos demuestran así ser la matriz más conflictiva, dado que en Seilagua® la eficacia demostrada para los métodos clásicos de análisis microbiológicos de aguas es del 80% (con un 20% de análisis erróneos) y en Seilaparfum la eficacia demostrada para los métodos clásicos de análisis microbiológicos de cosméticos es del 78% (con un 22% de análisis erróneos).

Achacamos este problema de los alimentos, principalmente, al uso de agua de peptona tamponada en la solución madre, caldo que se limita a tamponar pero NO elimina residuos de conservantes o productos inhibitorios (conocidos como tales en el alimento o no) que pueden estar presentes en la muestra, como sí que ocurre en las muestras de aguas y cosméticos, donde todo laboratorio sabe que ha de usar tiosulfato sódico en el primer caso para inactivar el cloro, y LPT Neutralizing Broth en el segundo para inactivar todos los conservantes cosméticos. Por este motivo en Microkit recomendamos (y aplicamos) desde hace años (véase en bibliografía el estudio intercolaborativo publicado ya en 1998), la sustitución del agua de peptona tamponada por Buffered Peptone Neutralizing Broth, con los inmejorables resultados que demostramos también aquí.

A747	B994	D164	D214	D265	D879	D911	F03M	F157
P	P	P	A	P	P	P	P	P
F297	F310	F465	1367	2222	2732	2966	5544	7213
P	P	P	P	P	A	P	A	P

Tabla 4. Ejemplo de resultados cualitativos de *Salmonella spp.* Presencia (50 ufc/g). Tres laboratorios (A) de los 18 que la analizan no la detectan. Informe 27, septiembre de 2005.

Método	% lab. que lo usan	% falsos negativos
Petrifilm	47	0
Compact-Dry-Plates® EC	16	0
MugPlus Cfs.Agar	13	0
ISO 7251/ISO 16649	13	0
Coli ID	9	33

Tabla 5. Ejemplo de la eficiencia de los diferentes medios de cultivo y kits utilizados en la detección de Coliformes y de E.coli. Informe 35, septiembre de 2007.

Método	% lab. que lo usan	% falsos negativos
ISO 6579 con XLD y otros agares	53	37
ISO 6579 con XLD y Chromosalm	34	0
MK Tetratonato + SS Agar	3	100
Caldo GN + SS Agar + DCA	3	100

Tabla 6. Ejemplo de la eficiencia de los diferentes medios de cultivo y kits utilizados en la detección de Salmonella. Informe 34, junio de 2007.

Método	% lab. que lo usan	% falsos negativos
ISO 6888/ Baird Parker	47	16
RPF	45	50
Petrifilm	3	0

Tabla 7. Ejemplo de la eficiencia de los diferentes medios de cultivo y kits utilizados en la detección de Staphylococcus Aureus. Informe 33, abril de 2007.

Todo ello demuestra que los métodos *oficiales strictu sensu* funcionan peor que los métodos propuestos en los protocolos Microkit o, al menos, que están mal implantados en los laboratorios participantes. Esto es lógico, ya que los protocolos Microkit no son sino la mejora de las normas ISO a raíz de los fallos detectados en éstas en Seilalimentos.

Por todo ello validamos el protocolo Microkit como el más eficiente (100% eficiente) y sometemos a la consideración de cada laboratorio el mantenimiento del uso estricto de los protocolos que, hasta ahora, se han considerado de referencia (los deriva-

dos de los reales decretos y normas ISO/UNE citados en la bibliografía), o bien la implantación de los mismos con las mejoras propuestas por Microkit en sus protocolos y, al menos, en el presente artículo.

Los laboratorios que han ido levantando acciones correctivas a raíz de los resultados de sus participaciones en Seilalimentos, han encontrado en esta herramienta de intracomparación, la forma más fácil y económica de validar la implementación de sus mejoras. Todos ellos han ido mejorando unos resultados que empezaron siendo, desde deficientes hasta muy deficientes (véase Tabla 1), y ahora son entre notables y excelentes (véase Tabla 2).

Conclusiones

De más de 1000 páginas de los informes Seilalimentos realizados en los últimos 10 años, puestas en común de lo que están haciendo los laboratorios de análisis de alimentos (industrias, laboratorios públicos y privados de análisis a terceros), se extraen estas conclusiones de la máxima trascendencia:

1. La proporción de resultados incorrectos (falsos positivos + falsos negativos) usando los métodos oficiales es muy alta, de casi un 29,1%, lo que corresponde a casi un fallo analítico cualitativo de cada tres investigaciones. Esto no significa necesariamente que dichos métodos sean inadecuados, quizá lo sea la implantación NO validada que hacen muchos laboratorios a ojos cerrados. Tampoco tiene por qué corresponderse con la realidad del día a día analítico, ya que los servicios intercomparativos suelen incluir "trampas" que no se dan en la naturaleza, para mostrar a los laboratorios participantes cuáles son su puntos más críticos. Pero sí alerta y refleja la situación general de los participantes ante muestras complejas.
2. Los parámetros más conflictivos en alimentos son los cualitativos (investigaciones), en concreto, y por orden decreciente de eficiencia (entendiendo la eficiencia como la escasez global de falsos positivos y de falsos negativos):

Parámetro	Eficiencia
1º <i>Staphylococcus Aureus</i>	47
2º <i>Listeria monocytogenes</i>	45
3º Hongos (levaduras y mohos)	3
4º <i>Staphylococcus coagulasa negativos</i>	47
5º <i>Clostridium Perfringens</i> y sus esporas	45
6º <i>Bacillus cereus</i>	3
7º <i>E.coli</i> , <i>Salmonella spp</i> , y <i>Shigella spp</i> .	47
9º <i>E. coli</i> O157	45

3. Las matrices más conflictivas (todas ellas dan lugar a más del 30% de errores analíticos) en los laboratorios que no usan el Buffered Peptone Neutralizing sino el Buffered Peptone Water han sido:

Matriz	Ineficiencia (%)	Matriz	Ineficiencia (%)
Soja	49	Salchichas de frankfurt	48
Carne en polvo	46	Azúcar (sacarosa)	38
Sal (ClNa)	38	Pimentón	36
Huevo líquido	33	Leche en polvo	33
Malta	31	Harina de pescado	31
Leche pasteurizada	30	Harina de trigo	28
Queso	27	Mayonesa	25
Carne fresca	25	Arroz precocinado	23
Crema de cacao	21	Pescado fresco	7
Zumo de naranja	6	Ineficiencia = falsos positivos + falsos negativos	

Tal y como abundamos en el tema de caldos revitalizadores, probablemente resultan inhibitorias para buena parte de la flora y si no se neutraliza este efecto inhibitor mediante un caldo adecuado (como el Buffered Peptone Neutralizing Broth de Microkit), los resultados se ven comprometidos a un nivel de un 30% de parámetros erróneos. También la presión osmótica que supone en algunas de ellas la preparación de la solución madre (1/10) resulta excesiva para muchos microorganismos (por ejemplo 10 g de sal o de azúcar en 100 ml de caldo es tres veces mayor a la concentración del agua de mar), por lo que en ellas debe partirse desde el comienzo de la dilución 1/100.

Vemos que no es un problema específico, sino general (23 de 35, 66% –2 de cada 3– de las matrices). Cuando un laboratorio desconoce el poder inhibitorio intrínseco de las muestras que analiza, debe tratarlas como si de hecho fuesen inhibitorias, preparando la solución madre con un caldo inactivador como el que recomendamos y se emplea siempre en otras matrices inhibitorias, como las cosméticas.

4. La falta de investigación rutinaria de ciertos parámetros en ciertos tipos de alimentos resulta sumamente peligrosa: *Vibrio Parahaemolyticus*, *Campylobacter Jejuni*, *E. coli O157*... Aunque no sean explícitamente buscados por las autoridades españolas excepto en casos muy concretos, existe una Ley General de Sanidad que exige la ausencia de patógenos en alimentos, además de que es evidente la necesidad de su control en pro de la salud humana. Gracias a Seilalimentos, ya existe, a fecha de envío de este artículo (abril de 2009), una proporción de laboratorios españoles buscando activamente estos patógenos emergentes. El caso nos recuerda el tema de *Legionella pneumophila* hace tan solo unos pocos años, en el que hasta que no hubo reiteradas muertes de población humana, y la consecuente legislación al respecto, no se implantó masivamente su búsqueda. Confiamos en que tras esta publicación, el porcentaje de laboratorios que saben detectar todos estos parámetros, aunque solo sea en su participación en Seilalimentos, suba al 100%, sin necesidad de esperar a que la legislación prospere al ritmo de los actuales tiempos de globalización.

5. El tema más conflictivo es el de la preparación de la solución madre en caldos generales como agua de peptona tamponada, peptona salina- Maximum Recovery Diluent, Ringer... que no son capaces de revitalizar adecuadamente la flora subletal, ya que no inactivan los conservantes naturales o añadidos que hay presentes en la mayoría de alimentos. Ya hace 10 años que refrendamos esta afirmación, desde que pudimos comprobarla en el estudio intercolaborativo señalado en la bibliografía, en el que comparamos los caldos generales más utilizados con el Buffered Peptone Neutralizing, un caldo en principio diseñado para control microbiológico de la efectividad de los desinfectantes, que ha arrasado en los últimos años en microbiología cosmética (gracias a Seilaparfum) como LPT Neutralizing broth y que ahora esperamos que lo haga definitivamente en microbiología alimentaria como Buffered Peptone Neutralizing.

6. El límite de detección de muchos laboratorios es inadecuadamente alto, como se demuestra en los servicios Seilalimentos en los que dichos laboratorios no detectan valores inoculados de incluso 70 ufc/25 g de alguna de las cepas. Se reitera aquí lo argumentado en la conclusión 5.

7. El parámetro más conflictivo es *Staphylococcus Aureus*, sin duda por la interpretación de la coagulasa, sobre todo desde la implantación en muchos laboratorios del medio RPF. El medio Baird Parker proporciona muchos menos errores de interpretación, aunque no es infalible y necesita de confirmación con látex. Muchos laboratorios obtienen falsos positivos en estafilococos coagulasa negativos o en hongos, lo que demuestra una fuente de contaminación cruzada o externa. El

análisis alimentario

Baird Parker ha sido un medio demasiado bendecido por los métodos oficiales y el RPF, todavía más. En el parámetro más conflictivo de detección en alimentos, merece la pena comprobar la eficacia de las nuevas CompactDryPlates®-X-SA que incluyen un moderno cromógeno y no necesitan yema de huevo, ni telurito, ni detección de la coagulasa.

8. También es un parámetro conflictivo *Listeria monocytogenes*, si bien desde la adenda de 2004 de la ISO 11290, que invita al uso del agar Ottaviani & Agosti (Chromocytogenes Agar Microkit), la eficiencia de los análisis se ha disparado a niveles muy adecuados.
9. Otro tema muy conflictivo es la detección de hongos (levaduras y mohos), ya que pocos laboratorios aplican rigurosamente nuestras recomendaciones, que reiteramos aquí: las esporas de hongos flotan en el caldo diluyente en cuestión de segundos. Si no se agita inmediatamente antes de cada dilución y de cada siembra, y se toman alícuotas de la zona central del tubo, es poco probable que tomemos muestra representativa, y desde luego los recuentos se verán muy falseados.
10. La detección de Clostridios sulfito-reductores y de *Clostridium Perfringens* es problemática (aunque no tanto como en microbiología de aguas). La siembra en profundidad o con doble capa es imprescindible aunque se utilicen atmósferas anaerobias y testigos de correcta anaerobiosis.
11. El caso *Bacillus cereus* también ha mejorado mucho en los últimos años, desde que los usuarios han cambiado al medio Mossel PREP-MYP, con eficiencias que rondan en los últimos años el 90%.
12. Un 23% de resultados falsamente positivos o negativos en parámetros tan fundamentales como *E.coli*, *Salmonella spp.* o *Shigella spp.*, frente sensibilidades cercanas al 100% en los medios que recomendamos, debe alertar a todos los laboratorios de que hay modernos medios de cultivo que funcionan mucho mejor que los clásicos, por ejemplo MugPlus Cfs. Agar o TBX Agar para *E.coli*, Chromosalm para *Salmonella spp.* y SS Broth para *Shigella spp.*
13. Se observa que muchos laboratorios siembran indiscriminadamente en masa o en superficie según los medios de cultivo comerciales que adquieren sean placas preparadas o tubos-frascos preparados, cuando el rigor en microbiología nos exige sembrar en masa cuando buscamos recuento de aerobios totales, microorganismos fermentativos (como las levaduras y las Enterobacterias, coliformes y *E. coli*) o anaerobios (como *Clostridium Perfringens*), y sembrar en superficie cuando buscamos otros microorganismos que crecen bien de ambas maneras pero en superficie podremos confirmar después con más facilidad (como *Listeria monocytoge-*

Criotermostatos compactos

Criotermostatos de circulación potentes en diseño pequeño

NUEVO!



Modelos CF30 / CF40:

- ▶ Teclado con visualización LED
- ▶ Bomba de presión (15 l/min, 0.35 bar)
- ▶ Interfase RS232

Serie 'Economy'
Modelos CF30 / CF40

Modelos CF31 / CF41:

- ▶ ICC Sistema de control auto-optimizado
- ▶ Bomba de presión y succión (22-26 l/min, 1.1 bar)
- ▶ Nivel de bombeo ajustable
- ▶ Display VFD Comfort
- ▶ Conexión para sonda externa Pt100
- ▶ Programador integrado
- ▶ Interfase RS232/RS485
- ▶ Conexiones analógicas (accesorio)



Serie 'HighTech'
Modelos CF31 / CF41

Con la nueva serie 'CF' JULABO presenta cuatro criotermostatos de circulación muy compactos. Las reducidas dimensiones de solo 24 x 46 x 40 cm o 28 x 46 x 46 cm (A x L x Alto) permiten la colocación de los equipos en espacio limitado o en dispositivos técnicos. Dependiente del modelo es posible alcanzar hasta 470 vatios de potencia refrigerante.

Para obtener más informaciones sobre la serie 'CF' diríjese a nuestra página web o nuestro catálogo.

Julabo

Tecnología de Temperatura Innovadora

JULABO Labortechnik GmbH • 77960 Seelbach/Germany

☎ +49 7823 51-190 • 📠 +49 7823 2491

🌐 www.julabo.es

nes, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus Aureus*, *Vibrio Parahaemolyticus*, *Salmonella*, *Shigella*...) y sobre todo si son aerófilos extremos (como *Pseudomonas Aeruginosa* y los mohos).

14. Muy pocos laboratorios participantes demuestran utilizar de forma rutinaria cepas para controlar que su método, sus reactivos y sus analistas trabajan correctamente, con lo cual no detectan cuáles son los puntos críticos de sus análisis en los que poder aplicar indicadores de control. Ahora es muy fácil utilizar cepas de control, incluso hacerlas servir como material de referencia, gracias a las lentejas cuantitativas certificadas con incertidumbre de Microkit. Muy pocos laboratorios participantes identifican las colonias aisladas, que hemos de recordar que siempre son presuntivas en cualquier medio de cultivo sólido, incluidos los modernos cromogénicos. Con ello pierden importantísima información de los positivos que obtienen. Para ello Microkit ha desarrollado los diversos kits confirmativos necesarios para cada microorganismo según la Norma ISO que le aplique (M-IDENT®), con larga caducidad y escaso mínimo de pruebas. Y todavía menos laboratorios validan sus métodos analíticos con sus muestras, analistas y reactivos, cuando Sanidad lo exige activamente y ya existen cursos, protocolos y consultorías específicas sobre el tema, como las impartidas por Microkit.
15. Los medios cromogénicos para recuento de aerobios en placa, en concreto PCA-cromogénico de Microkit y Compact-Dry-Plates®-TC de Nissui Pharma, obtienen resultados más cercanos a la realidad (mayor exactitud frente al valor inóculo) que el clásico PCA, a causa de que las colonias, rojas, destacan sobre el color del medio y sobre las partículas de muestra, de modo que el ojo es capaz de observar más colonias de tamaño pequeño. La adición de reactivo TTC al medio de cultivo esterilizado y enfriado, para recuento total de aerobios también resulta adecuada, ya que la concentración a la que resulta inhibitorio es 10 veces superior a la que recomendamos aplicar en nuestros protocolos (que es de solo 1-2 ml de solución 1% en 1 l de medio final). La ventaja es la detección más cómoda para el ojo humano, al teñirse las colonias de rojo y distinguirse del medio, de las burbujas y de los restos de muestra. Incluso se obtienen mejores resultados con TTC, porque las colonias diminutas no pasan desapercibidas como en los medios clásicos: La validación interna realizada en Laboratorios Microkit con casi 100 cepas y la validación que resulta de la participación de numerosos laboratorios en Seilalimentos con este aditivo, así lo demuestran, al registrar con TTC recuentos siempre más elevados (aunque dentro de los z-scores del valor asignado mediante la intercomparación).
16. Muchos laboratorios recuentan sin realizar triplicados de placas o, si lo hacen, solo nos envían la media del recuento obtenido; esto les descalifica para la participación en servicios intercomparativos, ya que con sus resultados no pueden incluirse en métodos estadísticos mínimamente fiables; pero además están arriesgando mucho en su día a día, al ofrecer resultados poco contrastados y que dependen demasiado del azar.
17. Muchos laboratorios expresan sus resultados de manera inadecuada, ya que "incontables" o ">1.000 ufc/g" o "<100 ufc/25 g" no son expresiones aceptables para un resultado microbiológico preciso.
18. Se observa que la siembra en masa por inclusión en agar caliente para el recuento de aerobios es un punto crítico más importante de lo que imaginábamos, ya que numerosos laboratorios (incluso con técnicos que gozan de décadas de experiencia en el análisis microbiológico) confían en su tacto y no esperan a que el medio esté suficientemente frío, impidiendo así muy a menudo el crecimiento de algunos de los microorganismos presentes. También gracias a Seilalimentos se demuestra que estos falsos negativos (o recuentos bajos) quedan totalmente descartados con métodos más modernos de siembra en masa sin calentamiento, como ha sido el caso de las Compact-Dry-Plates® -TC.
19. Resulta curioso que el método utilizado por 12 de los 21 laboratorios que obtienen la máxima calificación en los 7 últimos servicios de Seilalimentos sea, en todos los parámetros, el de las Compact-Dry-Plates® adecuadas para cada uno de dichos parámetros. Nos sumamos así a las validaciones ya certificadas por AOAC y Microval para alimentos.
20. Muy pocos laboratorios de alimentos le dan al agua la importancia extrema que merece como materia prima fundamental en sus productos, ya que casi ningún laboratorio de ese tipo de industrias participa en Seilagua®, creyendo que el hecho de obtener un buen resultado del análisis del producto final (una vez contrastado con ensayos intercomparativos como Seilalimentos) les permite bajar la guardia en el punto crítico más importante de cuantos tienen: el agua de producción. Por eso el R.D. 140/2003 de aguas de consumo humano exige a las industrias alimentarias el control del agua que interviene en producción y limpieza de sus instalaciones.
21. La mayoría de laboratorios de España se asustan ante la participación en un ejercicio intercomparativo como Seilalimentos y ni siquiera lo intentan, cuando se les asegura la máxima confidencialidad y se les aconseja como la mejor herramienta de control de calidad de sus procesos analíticos. Esta participación es ya obligada por Sanidad (y de forma ha-

análisis alimentario

bitual) por parte de cualquier laboratorio que quiera ser autorizado por las autoridades competentes de nuestro país. Pero es que además es la única herramienta con la que cuentan para poder conocer objetivamente el grado de fiabilidad de sus resultados analíticos. Y para mantener sus métodos revalidados en continuo.

22. Algunos laboratorios participan una vez en Seilalimentos y al ver que las técnicas y parámetros son mucho más complejos que aquellos a los que estaban habituados, no se vuelven a inscribir, perdiendo con ello toda posibilidad de comprobar la utilidad de la actualización de sus técnicas y parámetros obsoletos, que parten de protocolos elaborados en siglos anteriores.

23. Aunque no es la tónica general, algunos laboratorios participan en Seilalimentos para cubrir el expediente o por simple curiosidad, ya que no implementan mejora alguna tras los reiterados fallos analíticos que se detectan gracias a esta herramienta y los consejos apuntados en el informe.

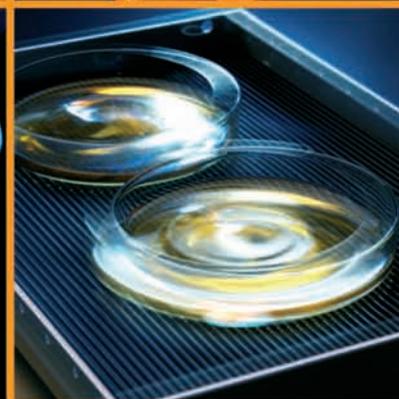
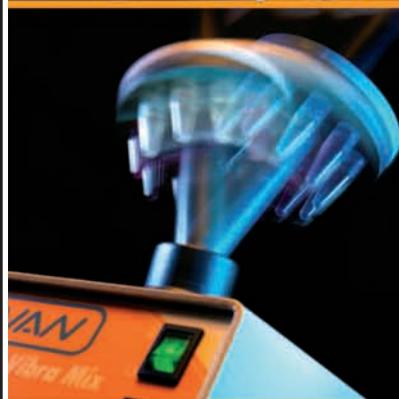
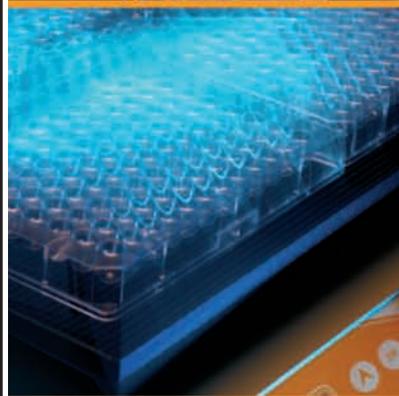
24. Como conclusión, es evidente que los laboratorios que participan asiduamente en los servicios intercomparativos Seilalimentos y leen y aplican los informes, demuestran la utilidad de estos servicios también en su versión intracomparativa, al aumentar sus calificaciones con respecto a sí mismos a causa de las mejoras que van implantando a raíz de los puntos críticos detectados y de las recomendaciones obtenidas en los informes trimestrales de este excepcional servicio para la mejora de la calidad analítica.

Agradecimientos

A todos los usuarios de Seilalimentos, y en especial a los habituales que trabajan con los 4 servicios anuales, por su fidelidad y todo lo que nos enseñan en el día a día y que ha quedado fielmente plasmado en este trabajo.

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.
- 1992. Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana. R. Eley. Acribia.



Especialistas en calor, frío y movimiento

Equipos diseñados para el cliente, desarrollados con tecnología de vanguardia que garantizan fiabilidad, seguridad, versatilidad y facilidad de uso.

Suministros Grupo Esper S.L.

Pintor Roig i Soler, 14

08916 Badalona

T: +34/ 93 465 70 02

F: +34/ 93 465 42 47

info@ovan.es

www.ovan.es



Equipos para laboratorio

- *Métodos de análisis microbiológicos de los alimentos*. Corrie Allaert, Marta Escolá, Díaz de Santos, 2002.
- R.D. 3484/2000. Normas de higiene para elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas.
- Directiva Europea 2073/2005 de 15 de noviembre sobre Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión 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 6888. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa-positivos (*Staphylococcus Aureus* y otras especies).
- UNE-EN 12824. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de Salmonella (ISO 6579:1993, modificada).
- UNE-EN ISO 21567. Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para el recuento de *Shigella spp.*
- ISO 10272. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal methods for the detection and enumeration of *Campylobacter spp.*
- UNE-EN ISO 11290. Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*.
- UNE-EN 13401. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de *Clostridium perfringens*. Técnica de recuento de colonias (UNE-EN ISO 7937 modificada)
- UNE-EN-ISO 21871. Microbiología de alimentos: Método horizontal para el recuento de números bajos de presuntos *Bacillus cereus*.
- UNE-EN ISO 7932. Microbiología. Guía general para el recuento de *Bacillus cereus*. Técnica de recuento de colonias a 30°C.
- ISO 16649. Método de rutina para la confirmación de *E. coli* β -glucuronidasa positiva en productos alimentarios destinado al consumo humano o a la alimentación animal.
- ISO 16654. Microbiología de los alimentos. Método horizontal para detección de *Escherichia coli* O157.
- ISO 8914. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Guía general para la detección de *Vibrio parahaemolyticus*.
- 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.
- ISO 10273. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la detección de *Yersinia enterocolitica* patógena presuntiva.
- ISO 4832. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de coliformes totales. Técnica de recuento de colonias.
- ISO 21528. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*.
- ISO 7954. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de levaduras y mohos.
- Sanchis, J. *Estudio Intercolaborativo entre los distintos caldos de cultivo generales*. XI Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Pamplona. 09/1998.
- Sanchis, J. *Comparación entre los diversos medios comerciales para aislamiento de hongos (levaduras y mohos)*. *Técnicas de Laboratorio*, N° 211. 05/1996
- Santos, C.J., Araujo, M., Gómez, M.J., Garrido, M.J.- *Evaluación de medios de cultivo para la detección de Escherichia coli en aguas*. XVII Congreso de la Sociedad Española de Microbiología. Granada. 09/1999
- Sanchis, J. Validación del medio cromogénico Chromosalm de Microkit para Salmonella mediante un estudio intercolaborativo. *Técnicas de Laboratorio*, N° 281. 11/2002.
- Informes Seilalimentos del 1 (marzo de 1999) al 37 (marzo de 2008), Laboratorios Microkit, Marzo-1999
- PRT-SEILA-001: Protocolo global validado para la ejecución correcta de análisis de alimentos (e intercomparativos Seilalimentos) (42 págs.).
- PNT-AL-001: Alimentos: Recuento de *Listeria monocytogenes* (17 págs.).
- PNT-AL-002: Alimentos: Investigación de *Listeria monocytogenes* (18 págs.).
- PNT-AL-003: Alimentos: Recuento de microorganismos a 30 °C (50 págs.).
- PNT-AL-004: Alimentos: Recuento de *E.coli* β -glucuronidasa positiva (48 págs.).
- PNT-AL-010: Alimentos: Investigación y recuento de Enterobacterias (60 págs.).
- PNT-AL-016: Alimentos: Investigación y recuento de *Bacillus cereus* (51 págs.).
- PNT-AL-017: Alimentos: Investigación de *Vibrio parahaemolyticus* (53 págs.).
- PRT-AL/AG-020: Análisis microbiológico del ambiente y operarios en industria agroalimentaria (61 págs)
- PRT-VAL-001 Protocolo para VALIDACIÓN en microbiología (69 págs.).
- PRT-VAL-1+2, Idem, incluido CD con hojas de cálculo en Excel.

www.laboratoriosmicrokit.com

(Véase anuncio en la sección
Guía del Comprador.)