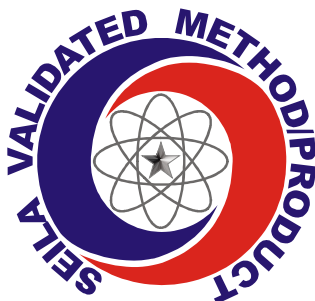


## CERTIFICADO DE VALIDACIÓN DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS



### Certificamos que el método y/o productos:

**Protocolo SEILALIMENTOS para análisis microbiológicos de alimentos** (ref. MICROKIT® PRT-SEILA-001, de 42 páginas y los específicos para cada parámetro derivados de aquél PRT-AL-001 a PRT-AL017), llevado a cabo mediante los medios de cultivo en él indicados: **LPT Neutralizing Broth** (Ref. MICROKIT® DMT217, RPL054, TPL053S), **SS Broth** (DMT067, TPL401), **CHROMOSALM Agar** (DMT500, TPL402, RPL012, PPL925), **XLD Agar** (DMT142, TPL504Z), **COMPACT-DRY-PLATES®-SL** (1002973), **B.cereus PREP-MYP Mossel Agar** (DMT015+SAJ001, TPL300+SAJ001, RPL002+SAJ001), **O157 Broth** (BCD165+BCX150, RPL203), **Sorbitol MacConkey Agar** (BCD161+BCX161, RPL025), **MugPlus Cfs.Agar** (DMT400, TPL400, RPL444), **MCC Broth** (DMT900, TPL637), **COMPACT-DRY-PLATES®-EC** (1000168), **Cetrimide Agar** (DMT034, TPL100, RPL010), **LEB** (DMT070, TPL033, RPL205), **Chromocytogenes Agar** (DMT700+SMT700, PPL970), **Alk-Saline Broth** (DMT159), **Vibrio Hipersaline Broth** (DMT137, TPL502), **TCBS Agar** (DMT119, TPL506, PPL922), **COMPACT-DRY-PLATES®-VP** (1000900), **TSC Agar** (DMT175, TPL137), **Baird Parker Agar** (BCD085+SBH011, TPL125+SBH011, RPL003+SBH011), **COMPACT-DRY-PLATES®-SA** (1000899), **Rosa Bengala Caf.Agar** (DMT101, TPL072, RPL034), **Sabouraud Caf. Agar** (DMT102, TPL073, RPL035), **COMPACT-DRY-PLATES®-YM** (1000869), **PCA** (BCD010, TPL071, RPL030), **PCA- CROMOGÉNICO** (BCD510, TPL271, RPL530), **COMPACT-DRY-PLATES®-TC** (1000166), **VRBG Agar** (BCD088, TPL058, RPL047), **COMPACT-DRY-PLATES®-ETB** (1002941),

**cumplen con los estándares de VALIDACIÓN de la Norma UNE-EN-ISO 16140:2003**, cuyos resultados se anexan. La validación está realizada mediante comparación utilizando cepas cuantitativas certificadas y trazables, frente a los métodos oficiales de referencia (Diversas Normas Técnicas vigentes o en fase final de aprobación ISO/UNE para microbiología de alimentos).

El presente certificado sólo es válido durante el periodo de vigencia de los métodos citados y aunque se garantiza trimestralmente, mediante revalidación intercomparativa SEILA, habrá de ser renovado antes de cinco años desde su fecha de emisión, indicada al pie.

Este certificado autoriza al usuario del método y de los medios validados, 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 y productos referenciados y amparados en este certificado.

Garantizado por:

A fecha: 16-07-2009

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



## ESQUEMA DEL PROTOCOLO VALIDADO MICROKIT PARA CONTROL MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS

25 g alimento ó Inóculo SEIALIMENTOS

225 ml de Buffered Peptone Neutralizing



- ★ En *Listeria* usar Semi-fraser ó LEB,
- ★ En *Vibrio* usar Alkaline-Saline y *Vibrio* hipersaline Broth,
- ★ En *Campylobacter* usar Campy Broth
- ★ En *E.coli* 0157 usar 0157 Broth

SOLUCIÓN MADRE ( $10^{-1}$ )

Agitar y dejar 25 minutos a 25 °C



Incubación 18-48h a 37°C

**MUESTRA ENRIQUECIDA**

para detección de patógenos

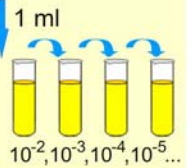
Para recuentos

Estría para aislamientos



1 ml en masa y por triplicado para cada dilución

9 ml Ringer, PBS, Buff P.Water, Buffered Peptone Neutralizing, Maximum Recovery-Peptone Saline... Serie de diluciones decimales para recuentos.



 <b>Coliformes y E. coli</b> 37°C 24h Mug Plus ó Compact Dry Plates EC + Indol
 <b>Bacillus cereus</b> 30°C 18-48h Agar Mossel y M-Ident B.cereus
 <b>Campylobacter (Microaerofilia)</b> Campy Agar      41.5°C 48h
 <b>Vibrio parahaemolyticus</b> TCBS y TSAT      35-37°C 18-24h
 <b>E.coli 0157</b> Sorbitol Mc Conkey Agar
 <b>Staphylococcus aureus</b> 37°C 24-48h Baird Parker ó Compact Dry Plates XSA + látex cogulasa
 <b>Salmonella</b> 37°C 24h XLD y Cromosalm ó Compact Dry Plates SL
 <b>Listeria monocytogenes</b> 37°C 24h Cromocitogenes y M-Ident X/R
 <b>Shigella</b> 37°C 24h XLD y SS Agar + enterutube

 <b>Aerobios totales</b> 30-35°C 48 h PCA Cromogénico ó Compact Dry Plates TC
 <b>Levaduras y Mohos</b> 25°C 3-5 días Rosa Bengala Caf Agar ó Compact Dry Plates YM
 <b>Enterobacterias</b> 37°C 24 h VRBG ó Compact Dry Plates ETB
 <b>Coliformes / E.coli</b> 37°C 24 h Mug Plus ó Compact Dry Plates EC + indol
 <b>Staphylococcus aureus</b> 37°C 24 - 48 h Baird Parker ó Compact Dry Plates XSA + látex cogulasa
 <b>Cl.perfringens (Anaerobiosis)</b> 37°C 24h TSC Agar y M-Ident Cl. perfringens
 <b>Bacillus cereus</b> 30°C 18-48h Agar Mossel y M-Ident B.cereus
 <b>Acidolácticas</b> 30-37°C 3-5 días MRS Agar

## ❖ METODO DE VALIDACIÓN

Se compara un mínimo de 20 muestras para cada uno de los parámetros microbiológicos implicados, la detección presencia/ausencia y el recuento obtenido siguiendo el **método MICROKIT®** (protocolo PRT-SEILA-001 y PRT-AL-001 a PRT-AG-017 de alimentos) con **cepas cuantitativas certificadas HPA**, con respecto al método oficial (Normas Técnicas vigentes ISO/UNE para microbiología de alimentos). Para ello se utilizan los **medios de cultivo MICROKIT®** descritos en dichos protocolos e indicados aquí.

Hacemos notar que las diversas CompactDryPlates® ya han sido previamente validadas por AOAC, Microval y NordVal; por ello, aunque incluimos pocas muestras a causa de la novedad que representan en España, se confirman los datos de dichas validaciones; nuestra intención era ampliar el rango de matrices alimentarias y verificar que en todas funcionan correctamente, como así ha sido (consultar bibliografía al final de este certificado).

También la validación de Chromosalm MICROKIT® para Salmonella ya había sido realizada previamente en otro ejercicio, en este caso de intercolaboración, en el que participaron 6 laboratorios, con 250 muestras comparadas de todo tipo de matrices naturales, publicado en el XIX Congreso de Microbiología de Santiago de Compostela y en Mayo de 2003 en La revista Técnicas de Laboratorio. Volvemos a confirmar, en este nuevo estudio de validación, su excelencia. Por otra parte, el Chromocytogenes MICROKIT® es exactamente el Agar Ottaviani & Agosti de la Norma ISO 11290:2004, pero queríamos verificar (ya que no siempre es así), que la fórmula allá expresada es la correcta, como queda patente con los resultados de este informe. Por otro lado, el Rosa Bengala Caf. Agar MICROKIT® lleva años siendo validado por el gran público, desde nuestra publicación de su excelencia comparativa en 1996, de modo que no hacemos sino corroborar que su éxito comercial se debe a la inmejorable calidad de todos sus parámetros de validación. Por fin, el MugPlus Agar MICROKIT® ha sido también validado con excelencia y demostrada su equivalencia, en matrices acuáticas, hasta el punto de ser recomendada su fórmula en la Orden SCO/778/2009 del Ministerio de Sanidad y Consumo (17-Marzo-2009), publicada en el BOE 31/Marzo/2009.


Por otra parte, se aprovecha para comparar todos los datos con los resultados obtenidos en 42 tipos de matrices alimentarias, en cada servicio idénticas y con inóculos idénticos, por los 100 laboratorios españoles participantes en el servicio intercomparativo SEILALIMENTOS de los últimos 10 años, con especial énfasis en los últimos, de 2007-2009, con un total de 42 tandas que suponen la comparación de más de **730 muestras** idénticas entre los participantes que utilizan el **MÉTODO DE REFERENCIA** y el **método MICROKIT®**, lo cual sirve además como **re-validación periódica** de éste. Dada la homogeneidad de resultados, resumidos en la publicación intercomparativa "Jun/2008: Conclusiones sobre la validación de los protocolos MICROKIT® optimizados para **análisis microbiológico de alimentos** versus la normativa relacionada, mediante los ensayos intercomparativos Seilalimentos. Técnicas de Laboratorio 341, 5/2009. XVI Congreso Nacional de microbiología de los alimentos. Córdoba, 9/2008", en esta nueva validación no se tienen en cuenta los datos de todas las muestras, sino las de los tres últimos años (12 circuitos intercomparativos entre 2007 y 2009), ya que hacerlo sólo multiplicaría un trabajo estadístico que resultaría redundante. Además en estos estudios de los 3 últimos años se utilizaban como inóculo cepas cuantitativas certificadas, de modo que obtuvimos dos métodos simultáneos de contraste: cepas patrón y método de pares por intercomparación. De entre los 100 laboratorios participantes, al menos 6 están acreditados para análisis microbiológicos por la Norma ISO 17025, conforme solicita la ISO 17994 de equivalencia de métodos microbiológicos.

**Restricciones de uso** del protocolo y los medios y kits de MICROKIT®: El alcance de la validación incluye todo tipo de matrices alimentarias, ya que las **MATRICES** empleadas fueron: canela, helado 3 sabores, pasteles, mortadela, queso, mejillones crudos, pollo, precocinado de arroz con judías, hamburguesas crudas, crema de cacao con avellanas, mahonesa, zumo de naranja, pescado crudo, leche pasteurizada, salchichas de frankfurt, pimentón, huevo crudo, sal, leche en polvo, malta, harina de pescado, glucosa, cubitos de carne en polvo, lactosa, soja, harina de trigo, autolisado de levadura, extracto de naranja, horchata, galletas, pasta, cereales extrusionados, puré de patatas, piensos animales, potitos infantiles, cacao...

## ❖ RESULTADOS

En letra azul, los resultados de **MICROKIT®** para detección y recuento en cualquiera de sus presentaciones. En letra negra los resultados del método de referencia. No se tienen en cuenta terceros métodos aunque se indican otros muy utilizados. Tampoco se tienen en cuenta los participantes de SEILALIMENTOS que no aplican estrictamente el método de referencia.

### 1. RESULTADOS DE PARAMETROS CUALITATIVOS

 <b>PARÁMETRO</b>	<b>SENSIBILIDAD (S)</b> <b>escasez de Falsos Negativos (F-)</b>		<b>ESPECIFICIDAD (E)</b> <b>escasez de Falsos Positivos(F+)</b>	
	<b>% MÉTODO MICROKIT®</b>	<b>% MÉTODO DE REFERENCIA</b>	<b>% MÉTODO MICROKIT®</b>	<b>% MÉTODO DE REFERENCIA</b>
<i>Salmonella spp.</i>	Caldo SS MICROKIT®: 7 F- de 40: <b>82,5 % S (1)</b> Chromosalm MICROKIT®: 6 F- de 75: <b>92,0 % S (1)</b> CompactDryPlates®-SL 0 F- de 18: <b>100% S</b>	ISO 6579 Salmonella: 28 F- de 74: <b>62,2 % S</b>	Caldo SS MICROKIT®: 0 F+ de 5: <b>100 % E</b> Chromosalm MICROKIT®: 0 F+ de 7: <b>100 % E</b> CompactDryPlates®-SL 0 F+ de 6: <b>100 % E</b>	ISO 6579 Salmonella: 3 F+ de 16: <b>81,2 % E</b>
<i>Shigella spp.</i>	Caldo SS MICROKIT®: 6 F- de 36: <b>83,3 % S (1)</b> Chromosalm MICROKIT®: 2 F- de 30: <b>93,3 % S (1)</b> CompactDryPlates®-SL 0 F- de 8: <b>100% S</b>	ISO 21567 Shigella: 17 F- de 21: <b>19,0 % S</b>	Caldo SS MICROKIT®: 0 F+ de 39: <b>100 % E</b> Chromosalm MICROKIT®: 0 F+ de 39: <b>100 % E</b> CompactDryPlates®-SL 0 F+ de 6: <b>100% S</b>	ISO 21567 Shigella: 1 F+ de 26: <b>96,2 % E</b>
<i>Bacillus cereus</i>	MÉTODO COMÚN: ISO 7932 Agar Mossel PREP-MYP 5 F- de 36: <b>86,1 % S</b>		MÉTODO COMÚN: ISO 7932 Agar Mossel PREP-MYP 2 F+ de 17: <b>88,2 % E</b>	
<i>E.coli O157</i>	CompactDryPlates®-EC 0 F- de 5: <b>100 % S</b>	ISO 16654 Sorb.McConkey 2 F- de 19: <b>89,5 % S</b>	CompactDryPlates®-EC 0 F+ de 3: <b>100 % E</b>	ISO 16654 Sorb.McConkey 0 F+ de 12: <b>100 % E</b>
<i>E.coli total (3)</i>	MUGPLUS MICROKIT®: 4 F- de 28: <b>85,7 % S (1)</b> CompactDryPlates®-EC 0 F- de 16: <b>100% S</b>	ISO 7251 BGBL 2% Broth 3 F- de 11: <b>72,7 % S</b> ISO 16649 TBX Agar 2 F- de 19: <b>89,5 % S</b>	MUGPLUS MICROKIT®: 0 F+ de 24: <b>100 % E</b> CompactDryPlates®-EC 0 F+ de 12: <b>100% E</b>	ISO 7251 BGBL 2% Broth 1 F+ de 13: <b>92,3 % E</b> ISO 16649 TBX Agar 0 F+ de 12: <b>100 % E</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MÉTODO COMÚN: CETRIMIDE AGAR 2 F- de 27: <b>92,6 % S</b>		MÉTODO COMÚN: CETRIMIDE AGAR 3 F+ de 43: <b>93 % E</b>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290 moderna-Chromocytogenes MICROKIT®: 4 F- de 68: <b>94,1 % S (1)</b>	ISO 11290 clásica-Palcam/Oxford 9 F- de 35: <b>74,3 % S</b>	ISO 11290 moderna-Chromocytogenes MICROKIT®: 1 F+ de 14: <b>92,9 % E (2)</b>	ISO 11290 clásica-Palcam/Oxford 0 F+ de 12: <b>100 % E</b>
<i>Clostridium perfringens o sulfito-reductores</i>	MÉTODOS COMUNES: ISO 7937 TSC Agar 8 F- de 13: <b>38,5 % S</b> TSN: 1 F- de 2: <b>50 % S</b> SPS: 1 F- de 1: <b>0 % S</b>		MÉTODOS COMUNES: ISO 7937 TSC Agar 3 F+ de 76: <b>96 % E</b> TSN: 2 F+ de 25 <b>92 % E</b> SPS: 0 F+ de 9: <b>100 % E</b>	
<i>Staphylococcus aureus (4)</i>	CompactDryPlates®-XSA 0 F- de 6: <b>100 % S</b>	ISO 6888 BAIRD-PARKER 29 F- de 91: <b>68,1 % S</b> ISO 6888 RPF 8 F- de 21: <b>61,9 % S</b>	CompactDryPlates®-XSA 0 F+ de 14: <b>100 % E</b>	ISO 6888 BAIRD-PARKER 17 F+ de 78: <b>78,2 % E</b> ISO 6888 RPF 11 F+ de 42: <b>73,8 % E</b>
Hongos (Levaduras y mohos) (2)	Rosa Bengala Caf. MICROKIT®: 7 F- de 45: <b>84,4 % S (1)</b> CompactDryPlates®-YM 3 F- de 31: <b>90 % S (1)</b>	UNE 34821 Sabouraud Caf. 11 F- de 39: <b>71,8 % S</b> ISO 7954 YGC (Caf.Glucose) 5 F- de 23: <b>78,3 % S</b> CENAN OGYE Agar 1 F- de 9: <b>88,9 % S</b>	Rosa Bengala Caf. MICROKIT®: 0 F+ de 3: <b>100 % E</b> CompactDryPlates®-YM 3 F+ de 10: <b>70 % E</b>	UNE 34821 Sabouraud Caf. 0 F+ de 6: <b>100 % E</b> ISO 7954 YGC (Caf.Glucose) 1 F+ de 6: <b>83,3 % E</b> CENAN OGYE Agar 0 F+ de 4: <b>100 % E</b>
Aerobios totales (2)	PCA-CROMOGÉNICO MICROKIT®: 0 F- de 15: <b>100 % S</b> CompactDryPlates®-TC 0 F- de 44: <b>100 % S</b>	ISO 4833 PCA 7 F- de 105: <b>93,3 % S</b>	NO PROCEDE	
Enterobacterias (2)	CompactDryPlates®-ETB 4 F- de 30: <b>86,7 % S</b>	ISO 21528 VRBG 14 F- de 126: <b>88,9 % S</b>	NO PROCEDE	
Coliformes (2, 3)	MUGPLUS MICROKIT®: 4 F- de 22: <b>81,8 % S (1)</b> CompactDryPlates®-EC 1 F- de 31: <b>96,8 % S</b>	ISO 7251 BGBL 2% Broth 5 F- de 20: <b>75 % S</b> VRBL: 5 F- de 40: <b>87,5% S</b>	MUGPLUS MICROKIT®: 0 F+ de 6: <b>100 % E</b> CompactDryPlates®-EC 0 F+ de 12: <b>100 % E</b>	ISO 7251 BGBL 2% Broth 0 F+ de 9: <b>100 % E</b> VRBL: 1 F- de 9: <b>88,9% S</b>

(1). Unas sensibilidades menores al 95%, pero mayores a las de los métodos de referencia, demuestran la idoneidad del uso de los métodos MICROKIT® también para *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *E.coli*, *Listeria monocytogenes*, Hongos (levaduras y mohos) y Coliformes.

(2). Aunque son parámetros eminentemente cuantitativos, la no detección en ellos suele implicar siembra en masa con el agar demasiado caliente o siembra en superficie con el inóculo mal agitado. Trabajando con los métodos que minimicen estos dos puntos críticos (Compact-Dry-Plates®, en el primer caso y agitación contundente inmediatamente antes de la siembra, en el segundo caso), los laboratorios aumentarán su eficiencia. Esto es especialmente importante en el caso de los hongos, donde los falsos negativos suelen deberse más a la falta de agitación inmediatamente antes de cada dilución y siembra, que al medio de cultivo, ya que las esporas de mohos flotan en cuestión de segundos.

(3). El medio Coli ID de Biomerieux ha sido incluido en esta validación, por la frecuencia de su uso en microbiología alimentaria en nuestro país, que supera incluso la del MugPlus. Los datos de validación demuestran que aún siendo mejor medio que los de referencia, el MugPlus lo supera en todos los parámetros de calidad: Para *E.coli*, MUGPLUS MICROKIT®: 85,7 % Sensibilidad y Coli ID obtiene 73%; comparten especificidad del 100%. Para Coliformes, MUGPLUS MICROKIT®: 81,8 % Sensibilidad y Coli ID obtiene 73,7%; en cuanto a especificidad, MUGPLUS MICROKIT®: 100 % y Coli ID obtiene 83,3 %.

(4). Existe un medio cromogénico para *Staphylococcus aureus* de uso creciente que, por su nefasta sensibilidad, en muestras alimentarias (0%) debemos declarar invalidado. Probablemente provenga del mercado para muestras clínicas, que nada tiene que ver con el mundo alimentario porque las primeras suelen ser cultivos masivos puros y el segundo todo lo contrario, concentración pobre de microorganismo diana y gran carga interferente.

Datos del estudio previo de 1999 a 2006 ya publicados en bibliografía:

 <b>PARÁMETRO</b>	<b>DATOS 1999 A 2006</b> <b>EFICIENCIA: SENSIBILIDAD + ESPECIFICIDAD</b> <b>(escasez de Falsos Negativos y de Falsos positivos)</b>	
	% MÉTODO MICROKIT®	% MÉTODO DE REFERENCIA
<i>Salmonella spp.</i>	Caldo SS MICROKIT®: 100 % EFICIENCIA Agar Cromosalm MICROKIT®: 96,4 % EFICIENCIA	ISO 6579, ISO 6579: 77 % EFICIENCIA
<i>Shigella spp.</i>	Caldo SS MICROKIT®: 100 % EFICIENCIA	ISO 21567: 77 % EFICIENCIA
<i>Bacillus cereus</i>	ES EL MISMO MÉTODO:	ISO 7932: 75 % EFICIENCIA
<i>E.coli O157</i>	ERA EL MISMO MÉTODO:	ISO 16654: 90 % EFICIENCIA
<i>E.coli total</i>	MUGPLUS MICROKIT®: 94,5 % EFICIENCIA	ISO 7251, ISO 16649: 77 % EFICIENCIA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ES EL MISMO MÉTODO:	UNE-EN-ISO 12780: 82 % EFICIENCIA
<i>Listeria monocytogenes</i>	ERA EL MISMO MÉTODO:	ISO 11290: 66 % EFICIENCIA
<i>Clostridium perfringens</i> o sulfito-reductores	ES EL MISMO MÉTODO:	UNE EN 13401: 72 % EFICIENCIA
<i>Staphylococcus aureus</i>	ERA EL MISMO MÉTODO:	ISO 6888: 65 % EFICIENCIA
Hongos (Levaduras y mohos)	Rosa Bengala Caf. MICROKIT®: 100% EFICIENCIA	ISO 7954, CENAN, UNE 34821, 70 % EFICIENCIA

Puede observarse que el histórico de años anteriores de intercomparación SEILALIMENTOS 1999-2006 induce a las mismas conclusiones que la actual validación con cepas cuantitativas e intercomparación SEILALIMENTOS 2007-2009: En todos los casos el método MICROKIT® es más eficiente que el método tradicional, sobre todo por su muy superior Sensibilidad en todos los parámetros. No es extraño cuando todos ellos son métodos creados a raíz de los deficientes

resultados obtenidos con los métodos clásicos, y que se han ido rediseñando conforme se iba verificando su mayor eficacia.

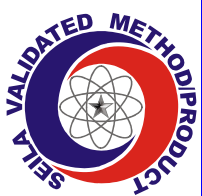
También los límites de detección resultan extraordinariamente optimizados mediante los protocolos MICROKIT®, ya que si bien es cierto que en principio no tendría por qué ser así, los datos demuestran innumerables casos de detección con nuestros métodos cuando el inóculo es bajo, que el método de referencia no ha sido capaz de detectar ni en el laboratorio piloto ni en los demás participantes del intercomparativo. No tenemos datos de lo que sucedería con inóculos que estuvieran entre medias del mínimo actual detectado con los métodos MICROKIT® y el mínimo actual detectado con los métodos de referencia en este estudio, ya que no hicimos valores inóculo de, por ejemplo 25 ufc de *E.coli* O157; la lógica insta a pensar que las diferencias entre ambos métodos no deberían ser tan grandes. Sin embargo, con los datos de los que disponemos, podemos afirmar que el método propuesto por MICROKIT®, demuestra lo acertado de dicho protocolo para poder detectar los microorganismos diana, incluso cuando éstos se encuentran a muy bajas concentraciones y en presencia de innumerables interferentes o acompañantes:

PARÁMETRO	LÍMITE DE DETECCIÓN CONFIRMADO DESDE *:	
	MÉTODO MICROKIT	MÉTODO DE REFERENCIA
<i>Salmonella spp.</i>	3 ± 1 ufc/25 g	4-16 ufc/25 g
<i>Shigella spp.</i>	80 ± 10 ufc/25 g	>>>171 ufc/25 g
<i>Bacillus cereus</i>	129 ± 9 ufc/g	
<i>E.coli</i> O157	15 ± 3 ufc/25 g	80 ± 10 ufc/25 g
<i>E.coli</i> total	92 ± 7 ufc/g	>>>240 ufc/g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95 ± 7 ufc/g	
<i>Listeria monocytogenes</i>	29 ± 4 ufc/g	29 ± 4 ufc/g
<i>Clostridium perfringens</i> o sulfito-reductores	50-70 ufc/g	
<i>Staphylococcus aureus</i>	202 ± 12 ufc/g	>>> 480 ufc/g
Hongos (Levaduras y mohos)	19 ± 3 ufc/g	30 ± 4 ufc/g
Enterobacterias	2-20 ufc/g	20 ± 3 ufc/g
Coliformes	20 ± 3 ufc/g	20-92 ufc/g

\* Hacemos notar que la incertidumbre microbiológica, a causa de la distribución contagiosa de microorganismos (Poisson o binomial negativa), nos impide afirmar que dos submuestras de cualquier alimento recién agitado son idénticas; por tanto nos impide asegurar, de una forma estadísticamente fiable, límites de detección inferiores a los mencionados, ya que en una submuestra puede haber 1 ufc, en otra 2 y en otra ninguna. Se observa que el método MICROKIT®, en todos los casos, se acerca mucho más al límite de detección ideal (teórico de 1 ufc/x g) que el método de referencia, de forma estadísticamente muy significativa. La imprecisión debida a la imposibilidad de mejorar el reparto homogéneo de cepas en las submuestras, nos permite intuir que el límite de detección en la realidad, se acerca mucho al ideal de 1 ufc/x g en el 100% de las muestras mediante los métodos optimizados por MICROKIT®.

## 2. RESULTADOS DE PARAMETROS CUANTITATIVOS

Incluimos los datos cuantitativos de todos los parámetros para los que están disponibles, incluso para aquellos donde no se exige más que su investigación/detección, a fin de obtener el mayor número posible de datos sobre la eficacia relativa de cada método:

 <b>PARÁMETRO</b>	<b>EXACTITUD</b> (medida en recuperación relativa: cercanía de los recuentos al valor patrón - valor inóculo de referencia o valor aceptado en el intercomparativo-)		<b>PRECISIÓN</b> (dispersión de resultados medida en repetitividad y reproducibilidad, capacidad de presentar resultados equivalentes) Aunque depende más de otros factores que del medio/método, lo incluimos por purismo	
	<b>% MÉTODO MICROKIT®</b>	<b>% MÉTODO DE REFERENCIA</b>	<b>% MÉTODO MICROKIT®</b>	<b>% MÉTODO DE REFERENCIA</b>
Aerobios totales	Compact-Dry-Plates® TC: 141 % *** ----- PCA-Cromogénico: 91 % *	PCA: 67% *	Compact-Dry-Plates® TC: ± 0,44 log y 14% de muestras fuera de rango: OK ----- PCA-Cromogénico: ± 0,07 y 14% fuera de rango : OK	PCA ± 0,48 log y 4% de muestras fuera de rango
Levaduras y mohos	Rosa Bengala Caf.Agar 189 % *** ----- Compact-Dry-Plates® YM 81,7 % *	Sabouraud Caf.Agar 131%*** YGC 212 % *** OGYE 208 % ***	Rosa Bengala Caf.Agar < ± 0,03 log, (y 10 % de muestras fuera de rango): OK	Sabouraud Caf.Agar ± 0,29 log y 33% muestras fuera de rango YGC ± 0,19 log y 8% fuera de rango / OGYE ± 0,17 log y 25% fuera de rango
Enterobacterias	Compact-Dry-Plates® ETB 127 % ***	VRBG: 73 % *	Compact-Dry-Plates® ETB ± 0,07 log y 0 % fuera rango OK	VRBG ± 0,01 log y 2,5 % de muestras fuera de rango
Coliformes	Compact-Dry-Plates® EC: 597 % *** MUGPLUS: 175 % ***	VRBA: 31 % * BGBL: 95 % *	Compact-Dry-Plates® EC: < ± 0,04 log, (y 0 % de muestras fuera de rango): OK MUGPLUS < ± 0,5 log y 0 % fuera de rango): OK	VRBA: ± 1,05 ** y 0% de muestras fuera de rango BGBL: ± 0,02 y 0% de muestras fuera de rango
E.coli	Compact-Dry-Plates® EC: 356 % *** MUGPLUS: 117 % ***	TBX: 36 % * BGBL: 26,5 % *	Compact-Dry-Plates® EC: < ± 0,07 (y 9 % de muestras fuera de rango): OK MUGPLUS ± 0,4 log y 0% de muestras fuera de rango: OK	TBX ± 0,07 log y 0% muestras fuera de rango BGBL: ± 1,45 ** y 0% muestras fuera de rango
Bacillus cereus	AGAR MOSSEL PREP-MYP 379 %*		No hay datos suficientes	
Listeria monocytogenes	CHROMOCYTOGENES: 113% ***	PALCAM: 148%***	No hay datos suficientes	
Staphylococcus aureus	Compact-Dry-Plates® XSA: 80% *	Baird Parker Agar 95 % * RPF: 121 % ***	Compact-Dry-Plates® STAF: < ± 0,1 log y 14% de muestras fuera de rango: OK	Baird Parker Agar < ± 0,06 y 9 % de muestras fuera de rango RPF: < ± 0,02 log y 6 % de muestras fuera de rango

\* Todo está totalmente dentro del valor estadístico standard de tolerancia de ± 2 log, aceptable. Aún así, los métodos VRBA para coliformes, así como TBX y BGBL para *E.coli*, mediante el método de recuperación relativa, no demuestran ser tan exactos como debería esperarse del método de referencia. El PCA clásico es mucho menos exacto que el cromogénico o que las Compact-Dry-Plates® TC, porque estos dos métodos evitan la confusión de colonias con partículas. El VRBG es mucho menos exacto que las Compact-Dry-Plates®-ETB porque la siembra en masa en agar caliente convierte buena parte de los microorganismos diana en inviables.

\*\* Aunque todas las precisiones están dentro de los estadísticos adecuados del ± 2 log, las más mediocres son las que obtienen el VRBA para coliformes y el BGBL para *E.coli*

\*\*\* Funcionan incluso mejor que las cepas patrón, ya que éstas refieren su recuento a otros métodos/medios clásicos, como el Agar-Sangre o el EMB Levine, por ejemplo.

Destaca también la máxima precisión de las Compact-Dry-Plates®-EC y ETB combinada con el hecho de que además incluyen un 0% de muestras aberrantes que se hubieran tenido que descartar del estudio por estar fuera de rango.

Destacamos que en el tema de precisión, buena parte de la imprecisión detectada se puede deber al componente analista y al componente interlaboratorio, más que al componente medio de cultivo o a su formato.

## ❖ CONCLUSIONES

1-Se observa que todos los métodos propuestos por MICROKIT® en sus protocolos, igualan o incluso MEJORAN los resultados analíticos de los métodos de referencia:

a) Los diversos medios de cultivo cromogénicos (MugPlus, Chromosalm, Chromocytogenes, PCA-Cromogénico), así como el Salmonella-Shigella Broth y el Rosa Bengala Caf. Agar , resultan más eficientes que sus homólogos clásicos. Todos ellos muestran mejor sensibilidad, especificidad, límite de detección, exactitud y/o precisión que los métodos clásicos de referencia, como resultado de años, casi décadas, de trabajo intercolaborativo e intercomparativo, que avalan la máxima eficacia de todos ellos. Los medios mencionados de MICROKIT®, demuestra lo acertado de su protocolo para poder detectar los microorganismos diana, incluso cuando éstos se encuentran a muy bajas concentraciones y en presencia de innumerables interferentes o acompañantes, ahorrando al laboratorio confirmaciones innecesarias de microorganismos que no son el que buscamos. Por todo ello quedan validados.

b) Las Compact-Dry-Plates® maximizan la sensibilidad, la especificidad, la exactitud y la precisión, al ahorrar el 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. Quedan validadas todas las Compact-Dry-Plates® mencionadas en este estudio, que con sus datos de validación demuestran no ser sólo la forma más cómoda y práctica de trabajar en microbiología, sino además la más fiable.

2-Todos los métodos MICROKIT® aquí expuestos, utilizados al pie de la letra con nuestros medios y kits, e independientemente de sus presentaciones, quedan validados porque son, al menos, tan fiables como el método de referencia con el que se han comparado, y lo cierto es que su mayoría lo son incluso más. Aunque algunos no superen el 95% de eficiencia respecto al valor inóculo, todos ellos son más eficientes que los métodos de referencia: Detectan y/o recuentan, en todos los casos, las concentraciones adecuadas de todos los grupos de microorganismos estudiados: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Bacillus cereus*, *E.coli O157*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, Hongos -levaduras y mohos-, Aerobios totales, Enterobacterias y Coliformes. Además, lo hacen como mínimo, tan bien como el método de referencia, demostrando unas muy superiores sensibilidad y especificidad, una mayor cercanía al límite de detección mínimo necesario, así como mejor robustez, facilidad de uso y economía que el método de referencia, en su implantación en los distintos laboratorios que los aplican.

3-La escasez de falsos positivos o mayor especificidad, permite a los laboratorios ahorrar tiempo y dinero en las confirmaciones de los falsos positivos que sí son necesarias en el método de referencia. Ese tiempo que ahorran pueden emplearlo en realizar más análisis, de modo que la implementación de estas técnicas optimizadas, aumenta el rendimiento global del laboratorio de análisis.

4-La escasez de falsos negativos o máxima sensibilidad, aconseja utilizar estos métodos. La mayor facilidad de uso de los métodos MICROKIT® permite realizar muchas más muestras en menos tiempo, al tiempo que se disminuye el número de puntos críticos del análisis y por tanto se aumenta su robustez.

5-El empleo de caldo Salmonella-Shigella, sustituyendo al caldo Rappaport, aumenta en un 20% la sensibilidad en la detección de Salmonella con respecto al seguimiento de la Norma ISO 6579 para Salmonella. Y en un 64 % la sensibilidad en la detección de *Shigella* en muestras complejas, con respecto al uso de la Norma 21567 o adaptaciones de la Norma ISO 6579 de Salmonella. De modo que hasta un 20 y un 64% de muestras con estos patógenos presentes, pueden no ser detectadas con el método oficial actual. En uno de los microorganismos más buscados y peligrosos de transmisión alimentaria, merece la pena hacer tan simple cambio de medio, en aras del aumento de detección en todo tipo de laboratorios.



6-El uso de Cromosalm Agar como segundo agar de aislamiento de la Normas ISO 6579, aumenta en más de un 30 % la sensibilidad en la detección de *Salmonella spp.* en muestras complejas, con respecto al uso de otros medios clásicos (BGA, SS Agar, Hektoen...) e incluso de otros modernos cromogénicos (Magenta-Gal). De modo que hasta un 30 % de muestras con este patógeno presente, pueden no ser detectadas con el método oficial actual.

7-El empleo de MugPlus Agar demuestra ser la mejor elección como medio de detección y recuento de Coliformes y *E.coli*, ya que combina las máximas sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión. Otro medio de gran éxito comercial (Coli-ID de Biomerieux) es también muy bueno, pero no tanto como el MugPlus. Por contrapartida, el método de recuperación relativa demuestra que el TBX y el BGBL para *E.coli* y el VRBA para coliformes no son tan buenos en cuanto a exactitud como debería esperarse del método de referencia. Además los métodos VRBA para coliformes y BGBL para *E.coli* resultan muy imprecisos.

8-La aplicación de la addenda 2004 de la ISO 11290 de *Listeria monocytogenes* permite a los laboratorios un aumento del 20% en la sensibilidad gracias al medio Ottaviani & Agosti que en MICROKIT® llamamos Chromocytogenes. Instamos a todos los laboratorios a aparcar el Oxford y el Palcam sustituyéndolo por este excelente medio de diseño italiano.

9-La escasa sensibilidad de todos los métodos de detección y recuento de Clostridios sulfito-reductores y *Cl.perfringens*, sin ser tan alarmante como en aguas, demuestra que los métodos están poco depurados. A menudo estos microorganismos, anaerobios estrictos, crecen con colonias blancas o grises que se dan como falsos negativos, al no ser negras, cuando en realidad esa es su forma de crecer cuando la anaerobiosis no es estricta y no pueden reducir bien los sulfitos. El citrato férrico amónico y el metabisulfito sódico son termolábiles y por ello los resultados de este parámetro son tan pobres. Deben añadirse asépticamente, como suplemento estéril (MICROKIT® VMT136), tras autoclavar y enfriar cualquiera de los medios implicados aunque ya lo lleven incorporado (SPS, TSC, TSN, Sulfite Iron Agar, Lactose Sulfite Broth...).

10-La interpretación de la coagulasa en Baird Parker y en RPF se demuestra muy conflictiva y una de las mayores fuentes de error analítico en alimentos. Son dos medios invalidados para aguas y para cosméticos. Y a pesar de que los datos de validación en alimentos son aceptables, resulta ser el parámetro más conflictivo en microbiología de alimentos. Por ello deberían tenerse más en cuenta las CompactDryPlates®-XSA, que parten de una base totalmente diferente que ha costado 3 años de diseño.

11-Los métodos para recuento de hongos (levaduras y mohos) son sorprendentemente buenos en todos los casos (YGC-Caf.Glucose Agar, OGYE, Sabouraud Caf., Rosa Bengala Caf.Agar) pero nuestra predilección por el Rosa Bengala Caf.Agar se debe a que además, los mohos invasores no se expanden en este medio, permitiendo contar en todas las placas y habiendo demostrado además en nuestro anterior estudio (Comparación entre los diversos medios comerciales para aislamiento de hongos -levaduras y mohos-: Excelencia del Rosa Bengala Caf.Agar. Técnicas de Laboratorio, Nº 211. 05/1996), que la diversidad de levaduras y mohos que recupera una misma placa es la máxima en este medio. Su color inconfundible ahorra tener que marcar las placas con su nombre. Por otra parte, observamos que muchos laboratorios obtienen resultados excesivamente bajos (no tenidos en cuenta en la validación, por aberrantes) independientemente del medio que usen; esto se debe a que las esporas de mohos flotan en cuestión de escasos segundos, de modo que si no se agita inmediatamente antes de cada dilución y de cada siembra, se pierden en la superficie de los caldos, dando lugar a falsos negativos o a recuperaciones muy pobres.

12-La sustitución del PCA clásico por PCA-cromogénico permite distinguir mejor las colonias de las partículas, pero sobre todo permite ver colonias pequeñas que pasan desapercibidas en el PCA. Esto no es una mera anécdota, ya que la diferencia de recuperación relativa validada entre el PCA-cromogénico y el PCA clásico es de nada menos que un 24% de ufc. Es decir, el PCA-cromogénico, recupera una media del 124% con respecto al PCA clásico. O lo que es lo mismo, el PCA clásico recupera sólo el 81 % de la flora aerobia que es capaz de detectar el PCA-

cromogénico. En el caso de las CompactDryPlates®-TC, la recuperación relativa supera en más del doble a la del PCA clásico, es decir, éste recupera menos del 50% de la flora aerobia que está presente, lo cual no es un buen resultado para un método de referencia; se conjugan dos puntos críticos para ello en el PCA clásico: la confusión de colonias con partículas del alimento y la siembra en masa en agar caliente que hace inviables buena parte de los aerobios presentes.

13- El método de recuperación relativa para Enterobacterias demuestra que el VRBG no es tan bueno como debería esperarse del método de referencia, ya que recupera un 73% del valor inóculo y sólo un 57,5% respecto al recuento de enterobacterias que están realmente presentes y es capaz de detectar el método CompactDryPlates®-ETB. Como en el caso del PCA, estos resultados tan mediocres del VRBG apuntan al shock térmico que sufren al sembrar en masa en agar caliente, punto crítico que no ocurre con el método recomendado por MICROKIT®.

14-Algunos laboratorios cometen graves errores de indetección por no utilizar los medios adecuados, por ejemplo no se puede utilizar Sorbitol MacConkey para *E.coli*, (cuando es un medio diferencial, sólo destinado para detección de sus cepas enterohemorrágicas O157), ni VRBG para coliformes (cuando es un medio glucosado, para Enterobacterias), ni VRBL para Enterobacterias (cuando es un medio lactosado, para coliformes). Ahorrar el coste de un medio de cultivo puede tener graves consecuencias en la salud pública con motivo de la emisión de certificados de análisis tan irresponsablemente firmados. También hay laboratorios que usan medios diseñados para microbiología clínica sin previa validación de los mismos para microbiología alimentaria, como se desprende de los resultados de sensibilidad 0% para un agar cromogénico para *Staphylococcus aureus* de (aún así) creciente éxito comercial.

15-No debe extrañar a los laboratorios obtener recuentos sistemáticamente superiores a los certificados en las cepas cuantitativas que emplean, cuando utilizan medios y kits de extraordinaria calidad, ya que los certificados van referidos a otros medios de otras marcas (por muy buenas que sean) y de otras características .

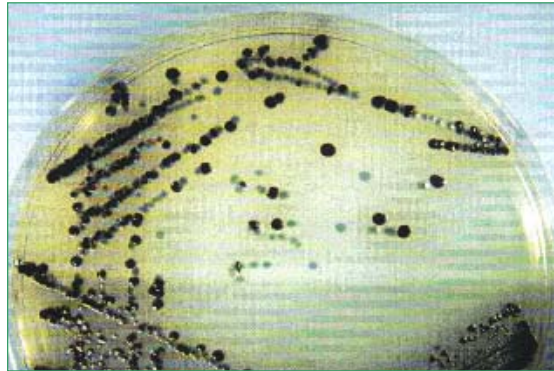
16- Confiamos que todo este trabajo, fruto de un tremendo esfuerzo conjunto en los 7 últimos años por parte de 100 de los muchos laboratorios de toda España que utilizan algunos de los métodos, medios y/o kits de MICROKIT®, sea bien aceptado por las entidades de acreditación, normalización e inspección. 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 muy optimizables, gracias a un concepto que nunca debe olvidarse en ningún laboratorio: la mejora continua sin trabas burocráticas que la limiten.

17-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 confirmaciones que ahora les resultan necesarias y luego no lo serán. Les recordamos que estas conclusiones de validación se pueden aplicar exclusivamente a los medios y 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 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!

❖ ANEXO FOTOGRÁFICO



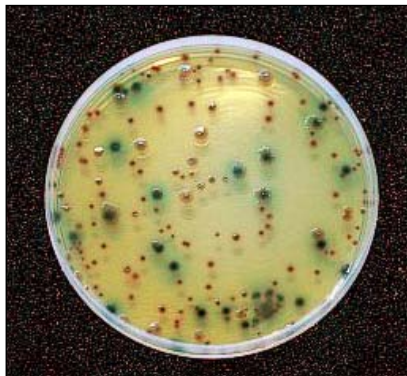
SS Broth MICROKIT®



Chromosalm Agar MICROKIT®



Compact-Dry-Plates® SL



MUGPLUS AGAR



Compact-Dry-Plates® EC



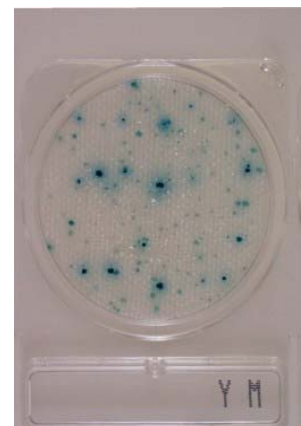
Chromocytogenes Agar



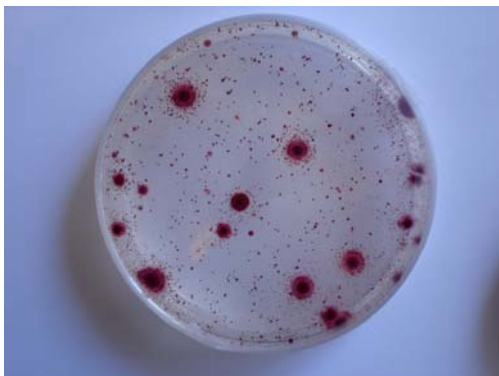
Compact-Dry-Plates®-XSA



Rosa Bengala Caf. Agar



Compact-Dry-Plates®-YM



PCA-Cromogénico MICROKIT®



Compact-Dry-Plates® TC



Compact-Dry-Plates®-ETB

## ❖ 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.
- ✚ 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 Union Europea, 22.12.2005
- ✚ 2008 Recopilación de Normas microbiológicas de alimentos. Manuel Moragas (Ayuntamiento de Bilbao) y M<sup>a</sup> 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): Excelencia del Rosa Bengala Caf. Agar. 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
- ✚ Validación del medio cromogénico de MICROKIT® para *Salmonella* (Chromosalm) mediante un estudio intercolaborativo. Jorge Sanchis Solera, Laboratorios MICROKIT y otros 14 autores. TECNICAS DE LABORATORIO 281, Mayo 2003.
- ✚ 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-001: Alimentos: Recuento de *Listeria monocytogenes* (17 páginas)
- ✚ PNT-AL-002: Alimentos: Investigación de *Listeria monocytogenes* (18 páginas)
- ✚ PNT-AL-003: Alimentos: Recuento de microorganismos a 30 °C (50 páginas)
- ✚ PNT-AL-004: Alimentos: Recuento de *E.coli* β-glucuronidasa positiva (48 páginas)
- ✚ PNT-AL-010: Alimentos: Investigación y Recuento de Enterobacterias (60 páginas)
- ✚ PNT-AL-016: Alimentos: Investigación y Recuento de *Bacillus cereus* (51 páginas)
- ✚ PNT-AL-017: Alimentos: Investigación de *Vibrio parahaemolyticus* (53 páginas)
- ✚ PRT-AL/AG-020: Análisis microbiológico del ambiente y operarios en industria agroalimentaria (61 págs)
- ✚ 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.