

## CERTIFICADO DE VALIDACIÓN MÉTODO LISTERIQUICK



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

**LISTERIQUICK de MICROKIT** (Y los medios en él empleados: **Buffered Peptone Neutralizing Water, LEB Broth y Cromocytogenes Agar Ref.MICROKIT DMT011, DMT070, DMT700 y SMT700, así como los medios preparados derivados**), cumple con los estándares de **VALIDACIÓN** en base a la Norma **UNE-EN-ISO 16140:2003**, cuyos resultados se anexan. La validación ha sido realizada mediante **comparación por el método de pares, frente a los métodos oficiales de referencia: ISO 11133 de control de calidad de medios de cultivo, ISO 11290 de *Listeria monocytogenes* y con cepas cuantitativas de referencia diana, interferentes y acompañantes**. Las validaciones de MICROKIT son inspeccionadas y certificadas en el alcance por terceros (TÜV Rheinland en sus auditorías ISO 9001).

Esta validación interna e intercomparativa será elevada a intercolaborativa en colaboración con algún laboratorio externo que participe/n en la misma, en muestras naturales de todo tipo de alimentos, de las que analice/n rutinariamente, comparando los resultados Listeriquick con los del método estándar.

El presente certificado sólo es válido durante el periodo de vigencia de los métodos citados y se garantiza trimestralmente, mediante revalidación intercomparativa SEILA (para todo tipo de alimentos), por lo que no habrá de ser renovado cada cinco años desde su fecha de emisión, indicada al pie; sólo habrá de hacerse siempre que haya cambios de diseño que puedan afectar significativamente los resultados.

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

Garantizado por:



Jorge Sanchis Solera

Coordinador Intercomparativos SEILA y Director de Calidad MICROKIT®

A fecha: 26-Marzo-2018

Actualizado a fecha: 04/03/2021

# INFORME DE VALIDACIÓN CUALITATIVA SOBRE LA INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN ALIMENTOS MEDIANTE EL MÉTODO RÁPIDO DE 36 h DE MICROKIT (LISTERIQUICK): BPNW, LEB Y CROMOCYTOGENES Agar

## 1. Objetivos

Comprobar si el método LISTERIQUICK de detección de *Listeria monocytogenes*, detecta este microorganismo adecuadamente en los alimentos más habituales donde puede encontrarse. Es decir, comprobar que la técnica utilizada, los medios de cultivo, equipos e instalaciones utilizados, así como los analistas que intervienen en esta validación para la detección de *Listeria monocytogenes*, son idóneos, con resultados aptos y fiables, determinados mediante la sensibilidad, la especificidad, la eficacia relativa, el límite de detección, la conformidad y la concordancia de nuestro método en la muestras alimentarias concretas que han provocado problemas de Listeriosis según la bibliografía.

## 2. Alcance

Las muestras de alimentos empleadas en esta validación y, por extrapolación, las muestras alimentarias en general.

## 3. Parámetros

El parámetro objeto de la presente validación es la detección de las cepas de *Listeria monocytogenes* a 30-37°C.

## 4. Diseño del experimento

Analizaremos con el método Listeriquick (Buffered Peptone Neutralizing Water BPNW, LEB Broth y Cromocytogenes Agar), duplicado con el método más habitual del mercado (ISO 11290 con semiFraser, Fraser, Ottaviani & Agosti Agar), un número de muestras suficiente que, previamente, habremos contaminado con cantidades conocidas muy precisas de microorganismos diana, interferentes y acompañantes. Así podremos comparar los resultados finales obtenidos con los resultados esperables (al emplear a la vez cepas cuantitativas) y aplicar las técnicas estadísticas adecuadas, lo más inteligibles posible, para evaluar el nivel de efectividad. Éste se podrá calcular mediante los parámetros estándar de validación cualitativa (Sensibilidad, Especificidad y Límite de detección, así como la Conformidad y la Concordancia). De este modo podremos tomar la decisión según el método quede o no quede validado en nuestro laboratorio (es decir, la Sensibilidad, la Especificidad, el Límite de detección, la Conformidad y la Concordancia cumplan con los estándares internacionales de aceptabilidad). Y todo ello con los tipos de alimentos más habituales, con nuestros equipos, con nuestros medios de cultivo, en nuestras instalaciones, mediante nuestros analistas... con una demostración basada en el método científico y en pruebas documentales.

El número de muestras elegido para esta validación se podría haber calculado de acuerdo con el criterio estándar de ser mayor o igual a la raíz cúbica del número de muestras que analiza un laboratorio medio anualmente, por lo que al ser éstas menos de 1000, un número de 10 sería el

adecuado. Sin embargo, al parecer nos muy pocas, elegiremos un término intermedio entre dicho criterio y el otro, menos extendido, de elegir la raíz cuadrada del número de muestras, de modo que de 1000 muestras analizadas al año, la raíz cuadrada serían 32 muestras para la validación. El número intermedio entre 10 y 32 preferimos que sea de 20 (triplicados en 20 positivos, 20 negativos y 20 positivos débiles), ya que con dicho número, 1 fallo de 20 muestras positivas ó 1 fallo de 20 muestras negativas representan respectivamente el 5%, justo la proporción de muestras que internacionalmente se considera como valor máximo aceptable de errores (tanto en falsos positivos como en falsos negativos) en ensayos cualitativos. Realizaremos pues el análisis de validación en 20 muestras contrastadamente positivas (para calcular la especificidad) y en 20 muestras contrastadamente negativas (para calcular la sensibilidad); Y de los negros (cepas sin muestra directamente inoculadas en placas) para verificar si la concentración actual de las cepas coincide con la del certificado del proveedor (para, de no ser así, tener en cuenta el recuento actual más que el certificado). Estas muestras negras no es necesario que sean 20, podemos hacer por ejemplo 6, una para cada cepa, en los medios de cultivo de la validación y/o los del certificado del proveedor, así, todas estas placas de negros en triplicados. Añadiremos otras 20 muestras para calcular el límite de detección, con la cepa diana a cada vez menor concentración, para evitar que el hecho de hacerlo en parte de las mismas 20 muestras positivas, interfiriese así en los resultados de sensibilidad, con supuestos falsos negativos que se deberían en realidad al hecho de utilizar cepas en valores muy bajos.

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

Empleamos muestras naturales, sin irradiar, pasteurizadas, ya que la presencia previa de *Listeria monocytogenes* que pudiese interferir en la validación (en los negativos) es muy poco probable en alimentos pasteurizados del mercado.

Previamente habremos inoculado en nuestras propias matrices, varias cepas (cuantitativas, de referencia, trazables, con indicación de su imprecisión inicial), siguiendo el método que queremos validar, así dopado con cepas de referencia, lo que nos permitirá conocer el valor esperable, para así compararlo con el valor obtenido y poder tomar decisiones acordes a los criterios de aceptabilidad estándar. Las cepas usadas persiguen el objetivo de emplear especies bacterianas interferentes y

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

En el caso concreto de detección de *Listeria monocytogenes* elegimos las dos dianas más habituales (WDCM 00019 y WDCM 00021), 2 cepas diferentes como interferentes (*Listeria innocua* WDCM 00017 y *Listeria ivanovii* WDCM 00018, al tener características bioquímicas y de crecimiento en placas del Agar normativo Ottaviani & Agosti muy similares a la diana, a una concentración muy superior a las diana y como acompañantes otras cinco cepas que sabemos que pueden crecer en los caldos elegidos aunque su morfología colonial sea muy diferente a la diana o incluso no crezcan en la placa: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* y el Gram negativo *E.coli*, a una concentración muy superior que las dianas y los interferentes, para que dificulten en el caldo de enriquecimiento la proliferación de las dianas. Ya que si sólo eligiésemos diana o si los acompañantes fuesen inviables en los medios usados, o si añadiésemos cantidades elevadas de diana y bajas de interferentes o acompañantes, la validación quedaría en entredicho, al no ponerse en el peor de los casos, como debe hacerse por definición de validación.

Se calculan cuántos ml y de qué concentración del banco de diluciones se debe partir para obtener finalmente en la muestra un número de  $23 \pm 5$  ufc de *L.monocytogenes* WDCM 00019 y de  $48 \pm 9$  de *L.monocytogenes* WDCM 00021 por 25 gramos o mililitros de la muestra. Para estudiar la sensibilidad y la especificidad, sería muy imprudente intentar llegar a un número inferior porque la incertidumbre microbiológica nos asegura que por debajo de este número habrá diversas alícuotas de 1 g ó ml con 0 ufc aunque estemos toda la mañana agitando para homogeneizar la muestra cuya media es de 1-2 ufc/g ó ml, lo cual anularía la validación); de  $10^5$  ufc de cada interferente y de  $10^6$  ufc de cada acompañante. En cambio para estudiar el límite de detección añadiremos otras tantas muestras con cantidades cada vez menores de la diana (ej: 20 , 15 , 10, 8 , 6, 5, 4, 3, 2, 1 de cada una de las dos *Listeria monocytogenes*), bajando proporcionalmente también las cantidades de interferentes y acompañantes.

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

O bien la regla de tres simple para ver cuántos µl de inóculo necesitaremos por cada muestra y cuantos ml de inóculo necesitaremos para el total de muestras.

Se ha de tener en cuenta que el volumen final inoculado de cada dilución de cepa sea suficiente para inocular todas las muestras y los blancos de cepas sin muestra. Y recordar que la muestra de 225 ml en la que están los 25 g de muestra -muestra tratada-, diluye por 10 la concentración que añadamos por gramo, de modo que para que en 1g de muestra haya 1 ufc, habremos de añadir 25 ufc en los 25 g, es decir, en el frasco de 250 ml de muestra diluida.

Las cepas diana se siembran siempre después de las demás: en el caso de las validaciones cualitativas, para evitar contaminaciones en las muestras negativas; en el caso de las validaciones

cuantitativas, además, para minimizar el tiempo durante el cual podrían multiplicarse a la espera durante el experimento.

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

El experimento se inicia el lunes día 20 de Marzo de 2018, los resultados se leen el día 22 (método Listeriquick) y el 23 (método ISO) y el informe se acaba de redactar el día 26 de Marzo de 2018.

## **5. Herramientas utilizadas**

### 5.1 Material de laboratorio e instrumental necesario

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

- Micropipeta rango 100 - 1000µL
- Micropipeta rango 10 - 100µL
- Puntas para micropipeta
- Agitador Vórtex
- Autoclave
- Estufa a 32°C ± 5°C
- Nevera
- Probetas estériles
- Frascos de 500 ml estériles
- Alcohol de 70º o toallitas desinfectantes
- Pinzas estériles
- Mechero bunsen
- Cabina de flujo laminar
- Placas de 90 mm estériles
- Balanza

### 5.2 Medios y diluentes utilizados

Medios y kits de MICROKIT	Lote y caducidad
Buffered Peptone Neutralizing Water	
LEB-Listeria Enrichment Broth	
SemiFraser	
Fraser	
Suplemento Fraser	
Cromocytogenes Agar	
Suplemento doble para Cromocytogenes	

### 5.3 Material biológico utilizado

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

Cepas MICROKIT	Concentración ± Precisión	Lote	Caducidad
<i>Listeria monocytogenes</i> WDCM 00019	1,02 ± 0,32 x 10 <sup>4</sup> CV 25,11%	20/04/16	20/04/2018
<i>Listeria monocytogenes</i> WDCM 00021	2,33 ± 0,5 x 10 <sup>3</sup> CV 21,45%	2/04/2018	2/04/2020
<i>Listeria innocua</i> WDCM 00017	9,4 ± 1,7 x 10 <sup>6</sup> CV 12,22%	15/06/2017	15/06/2019
<i>Listeria ivanovii</i> WDCM 00018	3,08 ± 0,68 x 10 <sup>6</sup> CV 12,89%	06/04/2016	6/04/18
<i>Bacillus cereus</i> WDCM 00001	1,62 ± 0,38 x 10 <sup>5</sup> CV 18,06%	14/09/2017	14/09/19
<i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00032	(1,06 ± 0,14) x 10 <sup>9</sup> CV 7,55%	06/04/2016	6/04/18
<i>Micrococcus luteus</i> WDCM 00111	1,04 ± 0,05 x 10 <sup>7</sup> CV 2,75%	18/04/2017	18/04/19
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00009	(3,36 ± 1,14) x 10 <sup>7</sup> CV 22,16%	13/10/2016	13-oct-18
<i>E.coli</i> WDCM 00013	(4,84 ± 3,26) x 10 <sup>7</sup> CV 43,17%	16/11/2016	16-nov-18

#### 5.4 Muestras empleadas

1-Salmón ahumado con eneldo
2-Requesón
3-Jamon york loncheado y envasado
4-Leche de cabra
5-Langostinos congelados
6-Paté de pato
7-Mortadela de aceitunas loncheada y envasada
8-Ensalada (canónigos embolsados, tomate, pimiento verde embolsado)
9-Queso azul envasado
10-Salchichas de cerdo
11-Frankfurt envasado
12-Pollo natural
13-Helados (miniconos de nata y chocolate)
14-Queso Brie envasado
15-Huevo hilado envasado
16-Boquerones en vinagre
17-Chorizo loncheado y envasado
18-Salsa romesco
19-Sobrasada envasada
20-Zanahoria rallada embolsada

## **6. Procedimiento**

### 6.1 Operativa con muestras inoculadas.

La técnica realizada se puede resumir de la siguiente manera:

Primero se verifica que las propiedades organolépticas (aspecto, olor) de las matrices es correcto.

- Para cada uno de los dos métodos preparamos 3x20 frascos con perlas de vidrio estériles, cada uno con 225 mL de BPNW (método Listeriquick) y de SemiFraser (método ISO) y cada uno con 25 g de muestra (total 20 muestras triplicadas diferentes, 20 para sensibilidad, 20 para especificidad y 20 para límite de detección), así como 9 placas adicionales de TSA y 9 de Cromocytogenes para los negros de cepas sin muestra (uno para cada cepa): Tomamos las muestras de las 9 cepas para plaquear directamente de su dilución más idónea y conocer la concentración real actual de cada cepa patrón, por si acaso es ahora muy diferente a la certificada por el proveedor en origen. Y por fin un blanco de muestra-mix sin cepas inoculadas, para contrastar que las matrices no contenían en origen los microorganismos diana y los 20 frascos sin inóculo son realmente negativos.
- Reconstituimos las cepas de laboratorio en tubos de 10 ml de Ringer ¼ solución isotónica. Con meticulosidad para no perder ninguna de las lentejas que conforman las mismas, para que no se queden pegadas a las paredes del tubo (lo que dificultaría y retrasaría su disolución) y bajen al fondo, dejando 10 minutos que se empapen y agitando después con un vortex para conseguir una correcta homogeneización.
- Realizamos los cálculos para determinar la cantidad de inóculo que se deberá traspasar a cada frasco con perlas para conseguir la cantidad de ufc que queremos en cada ml inicial. Una vez determinado este valor traspasamos dicho volumen de inóculo a los frascos con 25 g de muestra con micropipeta y puntas estériles. Tras ello, agitamos las muestras para su correcta homogeneización momentos antes de cada inóculo.

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

<i>Listeria monocytogenes</i> 19	<i>Listeria monocytogenes</i> 21	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	
23 ± 5	48 ± 9	9,4 ± 1,7 x 10 <sup>5</sup>	3,08 ± 0,68 x 10 <sup>5</sup>	
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
1,62 ± 0,38 x 10 <sup>4</sup>	(1,06 ± 0,14) x 10 <sup>4</sup>	1,04 ± 0,05 x 10 <sup>6</sup>	(3,36 ± 1,14) x 10 <sup>6</sup>	(4,84 ± 3,26) x 10 <sup>6</sup>

	<i>L.monocytogenes</i> 19	<i>L.monocytogenes</i> 21	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>St.aureus</i>	<i>M.luteus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.coli</i>
1:	23		940						
2:		48						3360	
3:	23						1040		
4:		48				1060			
5:	23								4840
6:		48			1620				
7:	23							3360	
8:		48					1040		
9:	23					1060			
10:		48							4840
11:	23				1620				
12:		48		308					
13:	23		940						
14:		48						3360	
15:	23						1040		
16:		48				1060			
17:	23								4840
18:		48		308	1620				
19:	23							3360	
20:		48						3360	

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

<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
9,4 ± 1,7 x 10 <sup>5</sup>	3,08 ± 0,68 x 10 <sup>5</sup>	1,62 ± 0,38 x 10 <sup>4</sup>	(1,06 ± 0,14) x 10 <sup>4</sup>	1,04 ± 0,05 x 10 <sup>6</sup>	(3,36 ± 1,14) x 10 <sup>6</sup>	(4,84 ± 3,26) x 10 <sup>6</sup>

	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>St.aureus</i>	<i>M.luteus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.coli</i>
1:	940		16200		10400		48400
2:		308			10400		48400
3:	940			10600			
4:		308				33600	48400
5:	940		16200			33600	
6:	940			10600	10400		
7:	940			10600			48400
8:						33600	48400
9:		308			10400		48400
10:	940		16200	10600			
11:	940			10600			
12:	940				10400	33600	
13:		308					48400
14:		308				33600	48400
15:				10600		33600	
16:	940		16200				
17:	940				10400		
18:						33600	48400
19:	940			10600	10400		
20:			16200			33600	

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

	<i>L.monocytogenes 19</i>	<i>L.monocytogenes 21</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>St.aureus</i>	<i>M.luteus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.coli</i>
1:	12		47		162				
2:	8			30		106			
3:	6		47				104		
4:		8		30				336	
5:		12	47						484
6:		6		30	162				
7:	6		47			106			
8:	3			30			104		
9:	8		47					336	
10:		6		30					484
11:	6		47		162				
12:	4			30		106			
13:		8	47				104		
14:	8			30				336	
15:		3	47						484
16:	12			30	162				
17:		4	47			106			
18:	3			30			104		
19:	4		47					336	
20:		3		30					484

- Una vez inoculadas con las cepas las 20 muestras positivas, las 20 muestras positivas débiles del límite de detección y las 20 muestras negativas, en sendos frascos de 25 g de muestra + 225 ml de BPNW, se añade a cada una 18 ml de LEB Broth a [x5] y se procede a incubarlas todas juntas y al mismo tiempo, 18h a 30-35 °C.

- Se inocula de forma idéntica 20 + 20 + 20 frascos con Semifraser (muestras 1' a 20') y se procede a incubarlas todas juntas y al mismo tiempo, 18h a 30-35 °C. Acto seguido, se pasa 1 mL de cada frasco recién agitado a un tubo Fraser y se incuba éste otras 18h a 30-35 °C
- Por cada frasco incubado (o tubo Fraser en el método ISO), esté o no turbio y/o virado a negro (prácticamente todos los tubos Fraser están negros, incluidas las muestras negativas, menos las muestras positivas 9,16 y 18, lo que da idea de la inutilidad del viraje de este medio como indicador de nada), estriamos en una placa de Cromocytogenes. Todas las placas de medios se incuban (todas las placas juntas e introduciéndolas a la vez en la estufa) a 30-35°C durante 18h, no apilando más de 8 placas ni permitiendo que las columnas se toquen entre si, ni a las paredes/suelo/techo de la estufa.
- Transcurrido el tiempo de incubación se estudia la aparición o no de colonias típicas diana en cada placa. No se trata de contarlas, ya que esta es una validación cualitativa y contar tras enriquecer no tiene el menor sentido. Se trata de ver si hay o no crecimiento de cepas diana (colonias verdes con halo), tanto en los positivos, como en los negativos, como en los positivos débiles.

## 7. Resultados

### 0) Blanco:

Se demuestra que no hay crecimiento de las diana (*Listeria monocytogenes*), de modo que las 20 matrices estaban libres de cepas sorpresa.

### a) Placas con inóculo positivo (CON CEPA DIANA)

MATRICES Y CEPAS	LISTERIQUICK	ISO 11290
1	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
2	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes SIN halo: +
3	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes SIN halo: +
4	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
5	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
6	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
7	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes SIN halo: +
8	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
9	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
10	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
11	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
12	Colonias verdes con halo sólo tras 36h de incubar las placas: FALSO -	Frasco negro, tubo negro, sin colonias verdes c/halo: FALSO -
13	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes SIN halo: +
14	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
15	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
16	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
17	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
18	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
19	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
20	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +

100% de coincidencia en ambos métodos, aunque el método ISO obtiene un 20% de presuntos falsos negativos (colonias verdes sin halo) y además el Listeriquick se lee 18 h antes que el método clásico

1/20 falso negativo (5%) en ambos métodos (pollo)

Se demuestra que la **sensibilidad** es idéntica en ambos métodos: 95%. La matriz de pollo fresco ha resultado en ambos casos falsamente negativa, lo que hace pensar que esa muestra podría tener algún inhibidor no declarado, o bien que la flora interferente (308 ufc de *L.ivanovii* frente a 48 ufc de la diana *L.monocytogenes* 21) haya provocado antagonismo, dado que tampoco había colonias verdes sin halo (además esta cepa de *L.ivanovii* provoca halo). Habría que estudiar si esto sucede siempre en muestras de pollo y, como prevención, en esta matriz, incubar las placas de Listeriquick 36h en vez de 18h (en el método ISO no han crecido colonias verdes con halo ni siquiera incubando las placas 72h)

**b) Placas con inóculo positivo débil (CON CEPA DIANA A BAJAS CONCENTRACIONES)**

MATRICES Y CEPAS	Valor inóculo	LISTERIQUICK	ISO 11290
1	12	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
2	8	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
3	6	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
4	8	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
5	12	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
6	6	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
7	6	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
8	3	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
9	8	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
10	6	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
11	6	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
12	4	Colonias verdes con halo sólo tras 36h de incubar las placas	Colonias verdes con halo sólo tras 36h de incubar las placas
13	8	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
14	8	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
15	3	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
16	12	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
17	4	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
18	3	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
19	4	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +
20	3	Colonias verdes con halo: +	Colonias verdes con halo: +

Valor inóculo: en negro *L.monocytogenes* 19 y en azul *L.monocytogenes* 21

100% de coincidencia en ambos métodos (curiosamente en los inóculos bajos el método ISO no obtiene los 20% de falsos negativos que obtuvo en los positivos fuertes, debidos a colonias verdes sin halo); aunque el Listeriquick se lee 18 h antes que el método clásico.

Vuelve a suceder lo del pollo en ambos métodos, por lo que se deduce que el problema es el pollo y no el inóculo, al haber otras matrices con la misma cepa a la misma concentración débil de 4 ufc/25 g sin problemas de detección tardía

Ambos métodos detectan adecuadamente incluso a la concentración más baja conseguida de cepa (**límite de detección demostrado** 3 ufc/25 g). Aunque el límite de detección sea en realidad 1 ufc/25 g, solo podemos demostrar 3 a causa de la incertidumbre microbiológica, que no nos permite garantizar inóculos de 1 ufc/25 g.

c) **Placas con inóculo NEGATIVO (acompañantes e interferentes SIN CEPAS DIANA)**

MATRICES Y CEPAS	LISTERIQUICK	ISO 11290
1	Colonias verdes sin halo: -	Sin colonias verdes: -
2	Colonias verdes con halo: Falso +	Colonias verdes con halo: Falso +
3	Colonias verdes sin halo: -	Colonias verdes sin halo: -
4	Colonias verdes con halo: Falso +	Colonias verdes con halo: Falso +
5	Colonias verdes sin halo: -	Sin colonias verdes: -
6	Colonias verdes sin halo: -	Colonias verdes sin halo: -
7	Colonias verdes sin halo: -	Colonias verdes sin halo: -
8	Sin colonias verdes: -	Sin colonias verdes: -
9	Colonias verdes con halo: Falso +	Colonias verdes con halo: Falso +
10	Colonias verdes sin halo: -	Colonias verdes sin halo: -
11	Colonias verdes sin halo: -	Colonias verdes sin halo: -
12	Colonias verdes sin halo: -	Sin colonias verdes: -
13	Colonias verdes con halo: Falso +	Colonias verdes con halo: Falso +
14	Colonias verdes con halo: Falso +	Colonias verdes con halo: Falso +
15	Sin colonias verdes: -	Sin colonias verdes: -
16	Colonias verdes sin halo: -	Sin colonias verdes: -
17	Colonias verdes sin halo: -	Sin colonias verdes: -
18	Sin colonias verdes: -	Sin colonias verdes: -
19	Colonias verdes sin halo: -	Sin colonias verdes: -
20	Sin colonias verdes: -	Sin colonias verdes: -
<b>TOTAL</b>	<b>5 falsos + de 20 antes de confirmar con Xylosa/Rhamnosa</b>	<b>5 falsos + de 20 antes de confirmar con Xylosa/Rhamnosa</b>

100% de coincidencia en ambos métodos, aunque el Listeriquick se lee 18 h antes que el método clásico

5 falsos positivos de 20 en ambos métodos, pero en ambos casos quedan descartados con la simple prueba de la Xylosa/Rhamnosa, demostrándose (como es cierto según el valor inóculo), que se trata de *L.ivanovii* en todos los casos.

0/20 falsos positivos (0%) en ambos métodos tras confirmar las colonias verdes con halo con la X/R

Se demuestra que la **especificidad** es idéntica en ambos métodos: 100%,

Curiosamente el Listeriquick genera 11/20 placas con colonias verdes sin halo (que no son falso +), producidas todas por *L.innocua*, mientras el método clásico sólo genera 5/20, también producidas todas por *L.innocua*.

## 8. Estudio estadístico de los datos

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

**8.1 Límite de detección** es el número de ufc a partir del cual se puede detectar de forma estadísticamente significativa la presencia del microorganismo diana, sin estar sometidos a posibles interferencias ni imprecisiones. Dadas la incertidumbre microbiológica y la distribución "contagiosa" de

Poisson de los microorganismos en las muestras (por más que agitemos nunca encontraremos todas las submuestras idénticas, ni en todas ellas tendrá por qué haber presencia de la cepa diana ni siquiera cuando dividiendo el número de ufc inoculadas por los ml afectados, el resultado sea  $> 1$  ufc/g), no podemos atrevernos a certificar que el límite de detección es 1 ufc, sino el valor inóculo acompañado de su incertidumbre, siempre que éste haya sido detectado en la mayoría de muestras, como así ha sucedido, por lo que en este caso **el límite de detección demostrado, para *Listeria monocytogenes*, es de 3 ufc/25 g** (tanto en el método validado como en el método clásico). Lo que no significa que el límite de detección no sea inferior, simplemente no hemos podido demostrarlo en este experimento.

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

#### **8.2 Sensibilidad:** escasez de falsos negativos.

En ambos métodos hemos obtenido 1 falso negativo de 20 (en pollo crudo), aunque en ambos casos hubo detección tardía de colonias verdes con halo pasadas 18 h más de incubación (54 h con Listeriquick y 72 h con el método ISO), por lo que la sensibilidad demostrada es del **95% en ambos métodos (del 100% sin tener en cuenta la muestra anómala de pollo crudo)**. No tenemos en cuenta el 20% adicional de falsos negativos del método ISO por colonias verdes SIN halo, ya que con X/R se demostró que sí eran de *L.monocytogenes*; aunque su mejor distinción con Listeriquick, apunta también mejor hacia éste.

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

Ya que el método oficial obtiene una sensibilidad también del 95%, queda respaldado el falso negativo de ambos métodos a causa de una matriz muy concreta donde ambos han fallado: el pollo. Quienes trabajen con pollo deben verificar si estos resultados se repiten en sus muestras o ha sido un tema excepcional inhibitorio del pollo concreto empleado en esta validación ¿con residuos desinfectantes que retrasan su manifestación en los medios de cultivo?. Si emplean Listeriquick, al menos en esta matriz saben, por la presente validación, que en 54 h si la detectarían, mientras en el método clásico se detectaría en 72 h.

**8.3 Especificidad:** escasez de falsos positivos.

Si no se confirman las colonias verdes con halo, la especificidad es inaceptable (en ambos métodos del 75%, con 5 falsos positivos de 20). Pero si se confirman con Xylosa/Rhamnosa, la especificidad es del **100% en ambos métodos**.

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

**8.4 Conformidad:** medida de Precisión en validaciones cualitativas.

Todas las muestras similares han dado resultados idénticos (repetitividad cualitativa) entre ambos métodos. No se ha estimado necesario analizar la concordancia (reproducibilidad cualitativa) al no intervenir más de un analista ni hacer repeticiones en días diferentes.

**8.5 Robustez** del parámetro ensayado: Denominamos así la capacidad del parámetro *Listeria monocytogenes* para optimizar la identidad de resultados entre los diferentes métodos/medios ensayados; de modo que cuanto más cercanos sean los resultados en los diferentes métodos, más robusto se considerará el parámetro. No hay que confundir esta robustez con la robustez de cada método, que viene en parte definida por los anteriores parámetros. Al ser la sensibilidad, la especificidad y el límite de detección idénticos en ambos métodos ensayados, concluimos que la robustez de este parámetro es del 100%.

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

Como consecuencia de todos estos resultados estadísticos, se demuestra que el método MICROKIT de acortamiento a 36 h de la ISO 11290 para *Listeria monocytogenes*, mediante mezcla del pre-enriquecimiento revitalizador con el post-enriquecimiento selectivo, en una incubación simultánea con BPNW y LEB Broth, sumado al posterior aislamiento en placas de Cromocytogenes y la posterior confirmación de colonias verdes con halo con el test de la Xylosa/Rhamnosa, cumplen con los 3 criterios estándar de validación cualitativa (Sensibilidad, Especificidad y Límite de detección) e incluso con los criterios adicionales de validaciones más profundas (Conformidad), por lo que dicho método se demuestra que puede ser usado de rutina en los análisis:

-El **límite de detección** demostrado desde 3 ufc/25 g en el peor de los casos

-La **Sensibilidad** obtiene un 95% en ambos métodos (100% si excluimos esa muestra anómala de pollo crudo)

-La **Especificidad** obtiene un 100% en ambos métodos.

-La **Eficiencia** (media entre sensibilidad y especificidad) es de  $(95 \% + 100\%) / 2 = 97,5\%$  (del 100% si excluimos esa muestra anómala de pollo crudo).

-La **Conformidad** en muestras repetidas es del 100%

**Concluimos que LISTERIQUICK detecta exactamente igual que el método ISO 11290, con la ventaja de ahorrar un día en la lectura de resultados, de modo que es un método excelente para la correcta detección de *Listeria monocytogenes* en todo tipo de muestras, y queda de este modo validado como, incluso, mejor que el método ISO.**

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

## 10. Bibliografía

- + 1992. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos.
- + 1982. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas del CENAN Instituto Nacional de Sanidad.
- + 1989. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Microbiología alimentaria: Detección de bacterias con significado higiénico-sanitario. Instituto de Salud Carlos III.
- + Métodos de análisis microbiológicos 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<sup>a</sup> Begoña de Pablo (Sanidad del Gobierno Vasco).
- + ISO 7218. Microbiología de los alimentos. Reglas Generales para los análisis microbiológicos.
- + ISO 11290. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes*.
- + Norma ISO/TS 11133-2:2003 Microb.alim: Preparación y producción de medios de cultivo-Pruebas de rendimiento
- + UNE-EN ISO 16140: Microbiología de los alimentos: Protocolo para la **validación** de métodos alternativos
- + ISO 5725: Precisión de los métodos de ensayo. Determinación de repetibilidad y reproducibilidad mediante intercomparativos
- + Informes SEILALIMENTOS 1 a 76 (total cerca de 3.000 páginas), Laboratorios MICROKIT, Marzo-1999 a Diciembre-2017
- + PRT-SEILA-001: Protocolo GLOBAL **VALIDADO** para la ejecución correcta de análisis de alimentos (e intercomparativos SEILALIMENTOS) (42 páginas)
- + PRT-VAL-001 Protocolo para VALIDACIÓN en microbiología (69 páginas)
- + 09/2008: PROTOCOLOS MICROKIT VALIDADOS PARA ANALISIS DE ALIMENTOS. Protocolos MICROKIT para control microbiológico de alimentos, VALIDADOS mediante 10 años de ensayos intercomparativos SEILALIMENTOS. XVI Congreso microbiología de alimentos. Córdoba, 9/2008
- + 05/2009: CONCLUSIONES DE LOS PROTOCOLOS MICROKIT PARA ALIMENTOS. Conclusiones sobre la validación de los protocolos MICROKIT optimizados para análisis microbiológico de alimentos frente a la normativa relacionada, mediante los ensayos intercomparativos Seilalimentos. Tecnicas de Laboratorio 341. Lifescienceslab 5.
- + 07/2009: PROTOCOLOS MICROKIT VALIDADOS PARA ANALISIS DE ALIMENTOS. Protocolos MICROKIT para análisis microbiológicos de alimentos. Alimentación, equipos y tecnología 245.
- + 03-2009: VALIDACION MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS. Validación de análisis de alimentos y esquema de trabajo. 12 pp. MICROKIT © 16-Julio-2009

**11. ANEXOS**

- Fotografías de la validación

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



Jorge Sanchis Solera, Director Técnico y Coordinador Seilalimentos, Lab.MICROKIT

Madrid, 26 de Marzo de 2018

## ANEXO 1

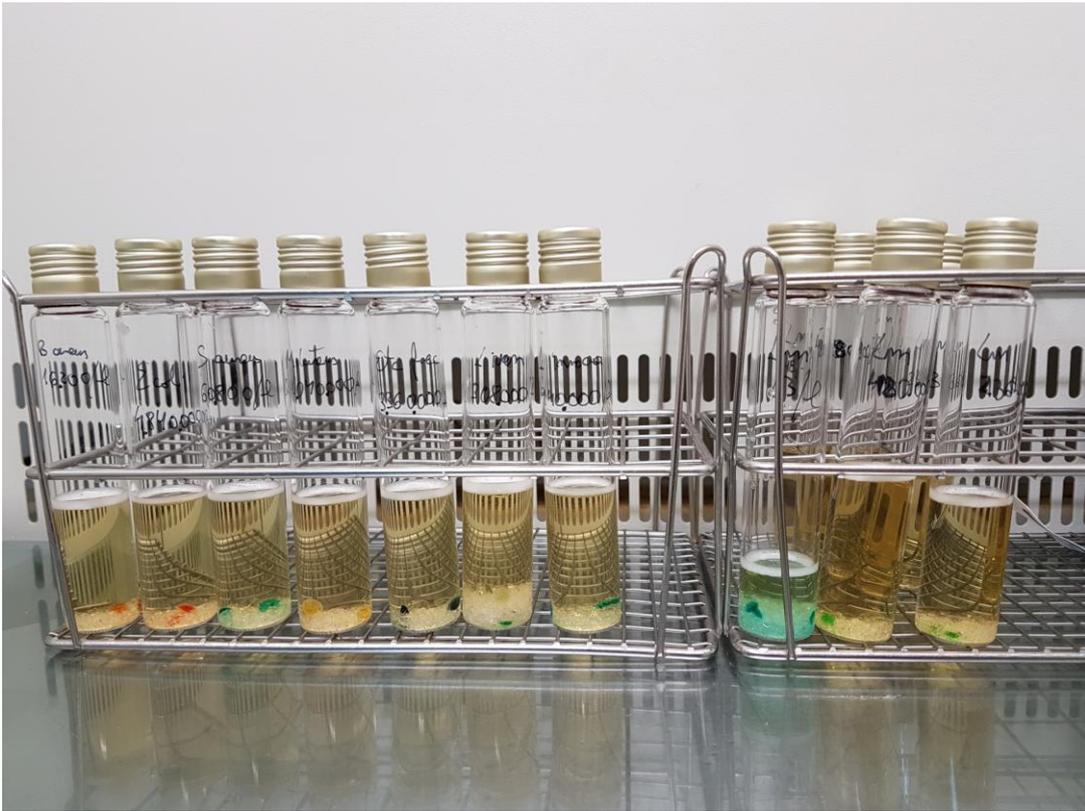
### Fotografías de la validación



Preparando la validación



Matrices elegidas para la validación de *Listeria monocytogenes*



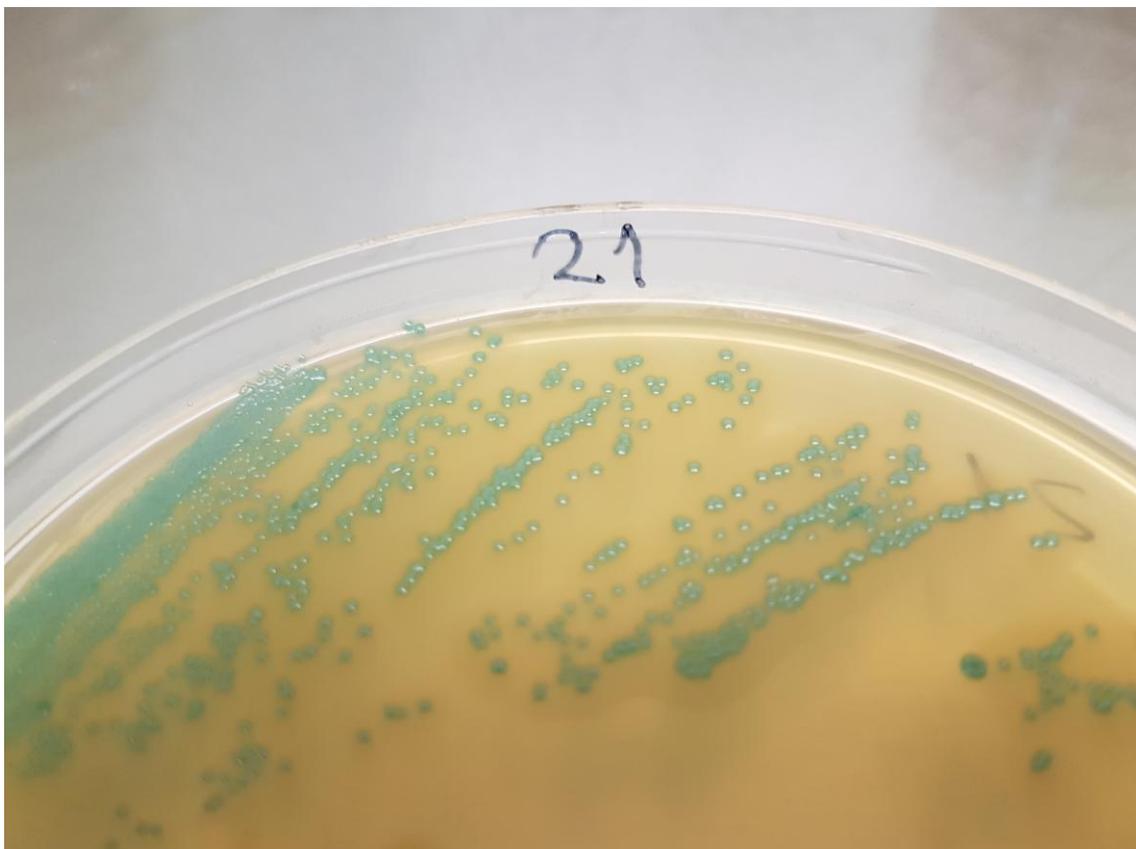
Cepas empleadas (diana a la derecha, interferentes y acompañantes a la izquierda)



Fascos empleados en la validación



Estriando en Cromocytogenes desde Fraser en el método ISO



Colonias verdes con halo en Cromocytogenes Agar



*Listeria monocytogenes*. Izda: sin inocular, Centro: con L-Rhamnosa vira a amarillo, Dcha: con Xylosa no vira a amarillo. Justo a la inversa que *L.ivanovii*.



Aspecto del kit LISTERIQUICK