

CERTIFICADO DE VALIDACIÓN Listeriswabbs-Green



Certificamos que el método y/o productos:

Listeriswabbs-Green (Ref.MICROKIT MW370), **cumple con los estándares de VALIDACIÓN en base a la Norma UNE-EN-ISO 16140:2003**, cuyos resultados se anexan. La validación del kit ha sido realizada con las más diversas cepas cuantitativas de referencia. Las validaciones de MICROKIT son inspeccionadas y certificadas en el alcance por terceros (TÜV Rheinland en sus auditorías ISO 9001).

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

Este certificado autoriza al usuario del método y 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: 19-Septiembre-2013
Actualizado a fecha: 04/03/2021

❖ METODO DE VALIDACIÓN

Entre Junio y Septiembre de 2013 se compara durante su diseño final un total de 60 muestras (duplicados) de superficies inoculadas con las 30 cepas de referencia cuantitativas más habituales en microbiología ambiental y alimentaria, mediante el método MICROKIT® *Listeriswabs-Green*, según la UNE 11133-2 sobre control de la fertilidad de los medios de cultivo cuantitativos, reflejada en los certificados de control de calidad de cada cepa empleada.

El nuevo sistema validado tiene grandes ventajas sobre el método clásico, al tratarse de escobillones que acceden a cualquier tipo de superficie (incluidas las escondidas, convexas, rugosas...); al contener el medio Ottaviani & Agosti (MICROKIT® *Cromocytogenes ISO 11290:2004*) que no proporciona los frecuentes resultados falsamente positivos de otros microorganismos esculina-positivos (como ocurre con otros kits de uso similar, que emplean Fraser semisólido); y al haber un viraje del positivo muy nítido de crema a verde (en lugar del subjetivo cambio de marrón a negro de otros kits); ahorra además el punto crítico de la fusión de agares del método tradicional para hacerse sus propias placas o tubos, así como mucha manipulación y tiempo de trabajo.

❖ RESULTADOS

Resultados relativos de detección viraje a verde (+++) o de mantenimiento del color crema (---) en tubos por duplicado.

Estudiamos los parámetros estándar de validación cualitativa con lectura de resultados a las 18 y 48 h:

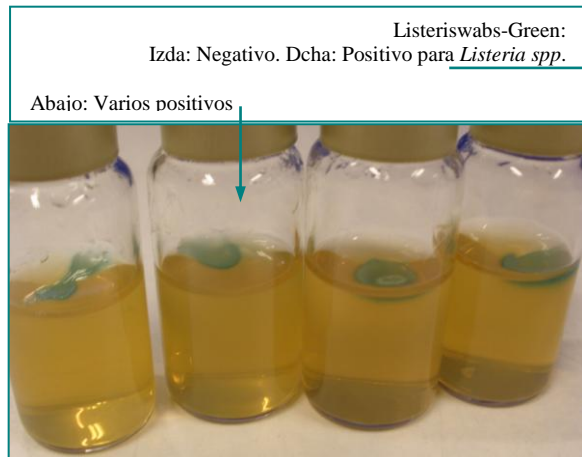
- Sensibilidad (escasez de resultados falsos negativos)
- Especificidad (escasez de resultados falsos positivos)
- Límite de detección (valor mínimo estadísticamente demostrado desde el que el kit detecta, teniendo en cuenta que la incertidumbre de la concentración las cepas no suele permitir que se puedan asegurar valores por debajo de 5 ± 3 ufc)

CÓDIGO WDCM O COLECCIÓN	MICROORGANISMO	CONCENTRACIÓN ufc/inóculo	Crecimiento 18h	Crecimiento 48h
WDCM00019	<i>Listeria monocytogenes</i>	$5,20 \times 10^2$	Viraje a verde/Idem	Viraje a verde/Idem
WDCM00019	<i>Listeria monocytogenes</i>	$6 \pm 1 \times 10^0 = 6 \pm 1$	Viraje a verde/Idem	Viraje a verde/Idem
WDCM00017	<i>Listeria innocua</i>	$6,86 \times 10^5$	Viraje a verde/Idem	Viraje a verde/Idem
WDCM00018	<i>Listeria ivanovii</i>	$3,54 \times 10^4$	Viraje a verde/Idem	Viraje a verde/Idem
MKTA35897Z	<i>Listeria welshimeri</i>	$2,88 \times 10^2$	Viraje a verde/Idem	Viraje a verde/Idem
WDCM00061	<i>Aerococcus viridans</i>	$4,88 \times 10^2$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM00144	<i>Aspergillus niger</i>	$1,46 \times 10^4$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
MKTN7464	<i>Bacillus cereus</i>	$1,33 \times 10^1$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
MKTD10	<i>Bacillus subtilis</i>	$1,36 \times 10^2$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
MKTM-R002	<i>Bacillus thuringiensis mix</i>	$7,70 \times 10^2$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
MKTN10743	<i>Burkholderia cepacia</i>	$2,40 \times 10^2$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM00055	<i>Candida albicans</i>	$3,19 \times 10^3$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
MKTD9893	<i>Caulobacter vibroides-crescentus</i>	>100 ufc	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM00077	<i>Citrobacter freundii</i>	$1,72 \times 10^5$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM00007	<i>Clostridium perfringens</i>	$1,30 \times 10^3$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM00080	<i>Clostridium sporogenes</i>	$6,40 \times 10^3$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM00009	<i>Enterococcus faecalis</i>	$2,46 \times 10^3$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM00090	<i>Escherichia coli</i>	$6,60 \times 10^2$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
MKTN9258Z	<i>Klebsiella aerogenes</i>	$2,26 \times 10^4$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
MKTD5175	<i>Klebsiella oxytoca</i>	$7,10 \times 10^3$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM00111	<i>Micrococcus luteus</i>	$2,50 \times 10^4$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
MKTB0038	Mix acidolacticas	$1,37 \times 10^5$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM00114	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$6,60 \times 10^1$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
MKTM-R001	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	$2,89 \times 10^3$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM00058	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$2,60 \times 10^4$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
MKTB7832	<i>Salmonella nottingham</i>	$1,52 \times 10^5$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM 00031	<i>Salmonella enterica typhimurium</i>	$5,48 \times 10^3$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM00035	<i>Staphylococcus aureus</i>	$2,70 \times 10^3$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM 00132	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	$3,16 \times 10^5$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM00038	<i>Yersinia enterocolitica</i>	$1,94 \times 10^5$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido
WDCM00023	<i>Proteus mirabilis</i>	$1,73 \times 10^5$	Inhibido/Inhibido	Inhibido/Inhibido

❖ CONCLUSIONES

- ✚ La sensibilidad encontrada es del 100%, al no haber ni un solo caso de resultados falsamente negativos.
- ✚ La especificidad encontrada es del 100%, al no haber ni un solo caso de resultados falsamente positivos.
- ✚ El límite de detección demostrado es de 5-7 ufc/test. Sin que ello implique que el kit no sea capaz de detectar 1 ufc/test, simplemente la incertidumbre microbiológica no nos deja demostrar valores inferiores a 5.
- ✚ Los datos a las 18 horas son idénticos que los datos a las 48 h, lo que da al kit una ventaja adicional de extrema rapidez.
- ✚ Las réplicas realizadas tanto en duplicados de kits como en repeticiones por parte de diferentes analistas y en diferentes días, no arrojan diferencia alguna entre el valor obtenido y el valor esperado.
- ✚ No hay ni un solo valor discrepante, lo que también habla en favor de la robustez del método y del kit.
- ✚ Por todo ello, queda VALIDADO el kit Listeriswabs-Green para detección de la presencia o ausencia de *Listeria* spp. en superficies, ya que con sus datos de validación demuestran ser, no sólo la forma más cómoda y práctica de trabajar en microbiología, sino además la más fiable. La mayor facilidad de uso de este método permite realizar muchas más muestras en menos tiempo, a la vez que se disminuye el número de puntos críticos del análisis y por tanto se aumenta su robustez incluso para usuarios poco acostumbrados a su manejo o a las técnicas microbiológicas.
- ✚ Dado que el medio vira a verde para todas las cepas de *Listeria*, hay que repicar los positivos estriando en placa de Agar Ottaviani & Agosti (MICROKIT® Cromocytogenes ISO 11290:2004), ya que en el tubito no se pueden observar los halos que distinguen la *L.monocytogenes*. Sin embargo, Listeriswabs-Green se convierte en un excelente método de screening negativo de muestras, ya que si en una superficie no detecta *Listeria*, se concluye con certeza que no hay *L.monocytogenes*. Sólo si el kit detecta la presencia de *Listeria*, habrá que confirmar estriando la superficie del tubito en una placa de Agar Ottaviani & Agosti (MICROKIT® Cromocytogenes ISO 11290:2004), para ver si se trata de *L.monocytogenes* (halo alrededor de las colonias verdes, en 18 h) o si son otras especies de *Listeria*.
- ✚ Confiamos que todo este trabajo sea correctamente 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 estancuen en métodos clásicos que hemos demostrado cómo son no sólo igualables en calidad, sino incluso mejorables, gracias a un concepto que nunca debe olvidarse en ningún laboratorio: la mejora continua sin trabas burocráticas que la limiten.
- ✚ Esperamos también que los laboratorios sepan aprovechar todas estas conclusiones para implementar desde ya los métodos más eficientes. No sólo obtendrán resultados más fiables, además ahorrarán tiempo mediante técnicas más avanzadas y selectivas, así como dinero al ahorrar muchas de las manipulaciones que ahora les resultan necesarias y luego no lo serán. Les recordamos que estas conclusiones de validación se pueden aplicar exclusivamente a los kits indicados de la marca MICROKIT®, ya que usando otras marcas tendrán que revalidarlo todo, porque nadie puede asegurar que vayan a comportarse de igual modo. MICROKIT ® es marca registrada en España y otros países, propiedad de Laboratorios MICROKIT, S.L. Todo proveedor que le ofrezca estos productos sin ser distribuidor oficial de Laboratorios MICROKIT, S.L. comete un delito por apropiación indebida y por uso ilícito de marcas, que debe ser dado a conocer al propietario de la marca por el laboratorio que lo detecte. ¡Es fácil comprender que no trabajamos para nuestros competidores, sólo solicitamos su apoyo en algo moral y legalmente correcto!
- ✚ Las validaciones de MICROKIT están respaldadas por terceros (las auditorías ISO 9001 por parte de AENOR/TUV Rheinland desde 1997), como consta en el alcance del certificado ISO9001, tal y como solicita el reglamento CE 2073/2005: *Se autoriza el uso de métodos analíticos alternativos cuando los métodos estén validados con respecto al método de referencia y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140, u otros protocolos similares internacionalmente aceptados*". En el caso de las validaciones de MICROKIT los terceros son TÜV-Rheinland en su auditoría anual de nuestro sistema de calidad, como se demuestra en el alcance de nuestro certificado ISO 9001. Algunos proveedores están difundiendo una interpretación deficiente de este reglamento, al asegurar que los terceros deben ser AOAC o AFNOR, lo cual es radicalmente falso. Dichos fabricantes son libres de externalizar sus validaciones, pero ello no implica que los demás hayamos de hacerlo también, si sabemos validar. De lo contrario, se estaría incurriendo en un delito de prevaricación y/o de acoso contra las pimes. MICROKIT es consultor de validación microbiológica desde el año 2000, habiendo formado en este tema a cientos de microbiólogos de España y diversos países de Iberoamérica, de dos formas: mediante cursos presenciales de teoría de la validación microbiológica, de 8 h de duración, con cientos de asistentes; y mediante cursos prácticos de 8 h de duración, in situ en el laboratorio de cada cliente interesado, con decenas de laboratorios así asesorados. Las aportaciones en materia de validación microbiológica de MICROKIT han sido muy bien recibidas por parte de ENAC. Un certificado de validación interna como el presente, que no es un simple diploma, sino que define los parámetros, resultados, conclusiones y limitaciones del producto validado, no puede ser rechazado por ninguna entidad de inspección ni de auditoría, lo mismo que no lo son los Certificados de Calidad internos de los productos ni los informes de intercomparación internos de empresas privadas.

❖ ANEXO FOTOGRÁFICO



❖ BIBLIOGRAFÍA

- ✚ 1992. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos.
- ✚ 1982. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas del CENAN Instituto Nacional de Sanidad.
- ✚ 1989. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Microbiología alimentaria: Detección de bacterias con significado higiénico-sanitario. Instituto de Salud Carlos III.
- ✚ Métodos de análisis microbiológicos de los alimentos. Corrie Allaert, Marta Escolá, Díaz de Santos, 2002
- ✚ DIRECTIVA EUROPEA 2073/2005 de 15 de Noviembre sobre Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Union Europea, 22.12.2005
- ✚ 2008 Recopilación de Normas microbiológicas de alimentos. Manuel Moragas (Ayuntamiento de Bilbao) y M^a Begoña de Pablo (Sanidad del Gobierno Vasco).
- ✚ ISO 7218. Microbiología de los alimentos. Reglas Generales para los análisis microbiológicos.
- ✚ UNE-EN ISO 11290. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. ISO 11290:1996 Modification 15-10-2004 of isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.
- ✚ UNE-EN ISO 11290. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 2: Método de recuento. ISO 11290:1998
- ✚ 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
- ✚ PRT-SEILA-001: Protocolo **GLOBAL VALIDADO** para la ejecución correcta de análisis de alimentos (e intercomparativos SEILALIMENTOS) (42 páginas)
- ✚ PNT-AL-001 Recuento de *Listeria monocytogenes* en alimentos. MICROKIT (17 páginas)
- ✚ PNT-AL-002 Investigación de *Listeria monocytogenes* en alimentos. MICROKIT (18 páginas)
- ✚ PRT-VAL-001 Protocolo para **VALIDACIÓN** en microbiología (69 páginas)
- ✚ PRT-VAL-1+2, Idem, incluido CD con hojas de cálculo en Excel.
- ✚ Informes SEILAMBIENTE 1 a 4 (Total: 120 páginas), Laboratorios MICROKIT, Nov-2006 a Nov-2012
- ✚ 09/2008: **PROTOS MICR KIT 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 MICR KIT 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: **PROTOS MICR KIT 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
- ✚ Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *Listeria monocytogenes* Version 3 – 20/08/2012 Brigitte CARPENTIER and Léna BARRE, EURL for *Listeria monocytogenes*, Maisons-Alfort Laboratory for Food Safety, ANSES, France
- ✚ BS ISO 17604-2003 Microbiology of food and feeding stuffs –carcass sampling for microbiological analysis