

## **RESUMEN VALIDACIÓN UNE-EN ISO 16140**

### **MÉTODO EASY QFAST® DETERMINACIÓN DE SALMONELLA MÉTODO CUALITATIVO**

---

**Fecha:** 08-05-17

Edición 4(08-05-2017)  
Nº de certificado: B59/000002

## ÍNDICE

<b>PRÓLOGO</b>	<b>2</b>
<b>1.- OBJETIVO DEL ESTUDIO</b>	<b>3</b>
<b>2.- MÉTODO ALTERNATIVO Y MÉTODO DE REFERENCIA</b>	<b>4</b>
<b>2.1.- PRINCIPIO Y PROTOCOLO DEL MÉTODO ALTERNATIVO TODAS LAS CATEGORIAS EXCEPTO MUESTRAS VETERINARIAS EASY</b>	<b>4</b>
<b>2.2.-PRINCIPIO Y PROTOCOLO DEL MÉTODO ALTERNATIVO PARA LAS MUESTRAS VETERINARIAS EASY QFast® Salmonella veterinaria</b>	<b>6</b>
<b>2.3.- MÉTODO DE REFERENCIA</b>	<b>11</b>
<b>3.- ESTUDIO DE COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS</b>	<b>11</b>
<b>3.1.- EFICACIA RELATIVA, ESPECIFICIDAD RELATIVA Y SENSIBILIDAD RELATIVA</b>	<b>11</b>
<b>3.2.- LIMITE DE DETECCION RELATIVA (LDR)</b>	<b>25</b>
<b>3.3.- INCLUSIVIDAD Y EXCLUSIVIDAD</b>	<b>27</b>
<b>4.- ESTUDIO COLABORATIVO</b>	<b>28</b>
<b>4.1.- ORGANIZACIÓN DEL ESTUDIO</b>	<b>28</b>
<b>4.2.- RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS</b>	<b>30</b>
<b>4.3.- CÁLCULOS</b>	<b>31</b>
<b>5.- INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO COLABORATIVO</b>	<b>35</b>
<b>6.- AUDITORIAS</b>	<b>38</b>
<b>7.- CONCLUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>ANEXOS</b>	
<b>Anexo 1 – Protocolo del método alternativo EASY QFast® y EASY QFast® veterinaria.</b>	<b>40</b>
<b>Anexo 2 – Método de referencia ISO 6579:2002-Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de <i>Salmonella</i> spp</b>	<b>42</b>
<b>Anexo 3 – Método de referencia: UNE-EN ISO 6579/A1 - Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de <i>Salmonella</i> spp. Modificación 1: Anexo D: Detección de <i>Salmonella</i> spp. en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria</b>	<b>43</b>

## PRÓLOGO

Los resultados obtenidos que figuran en las tablas correspondientes así como el tratamiento de ellos se han realizado según la norma UNE-EN ISO 16140.

**Fabricante:** iMICROQ, Integrated Microsystems for Quality of Life, S.L.

Polígono Industrial Riu Clar  
C/ Ferro 6 (nau 7)  
43006 Tarragona, Spain

**Laboratorio experto:** AENORlaboratorio

Miguel Yuste, 12, 4<sup>a</sup> planta.  
28037 Madrid

**Método a validar:** método Easy QFast®, método rápido para la detección de *Salmonella* spp.

**Referencia de validación** Norma UNE-EN ISO 16140: 2003. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Protocolo de validación de métodos alternativos.  
UNE-EN ISO 16140:2003/A1:2012

**Método de referencia:** Norma UNE-EN ISO 6579: 2003. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.

Norma UNE-EN ISO 6579 (2003). Erratum: 2007 V2. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.

Norma UNE-EN ISO 6579:2003/A1:2007. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Modificación 1: Anexo D: Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria.

### Alcance de la validación:

Muestras de alimentación animal

Muestras veterinarias

Muestras ambientales procedentes de producción primaria (industria avícola)

Alimentos en general: frutas y verduras, productos lácteos y productos varios, incluyendo especias, mayonesa y huevos, y carnes.

**Organismo de certificación:** AENOR INTERNACIONAL, S.A.U.

## 1.- OBJETIVO DEL ESTUDIO

Validación del método alternativo Easy QFast® para la determinación de *Salmonella* spp., según las directrices de la UNE-EN ISO 16140: "Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Protocolo de validación de métodos alternativos".

Según la citada UNE-EN ISO el protocolo de validación comprende dos etapas:

- Estudio comparativo del método alternativo frente al método de referencia realizado en AENORlaboratorio.
- Estudio colaborativo de cada uno de los dos métodos: método alternativo y método de referencia.

Alcance de la validación:

- Matrices:
  - Muestras ambientales procedentes de producción primaria
  - Muestras veterinarias
  - Muestras de alimentos en general
    - Frutas y verduras
    - Productos lácteos
    - Productos varios, incluidos huevos, mayonesa y especias
    - Carnes
  - Alimentos para animales

## 2.- MÉTODO ALTERNATIVO Y MÉTODO DE REFERENCIA

### 2.1.- PRINCIPIO Y PROTOCOLO DEL MÉTODO ALTERNATIVO TODAS LAS CATEGORIAS EXCEPTO MUESTRAS VETERINARIAS EASY QFast® *Salmonella*

#### 2.1.1.-PRINCIPIO

- a) Pre-enriquecimiento en medio 1

Añadir a 225 ml de medio de pre enriquecimiento la cantidad de muestra adecuada e incubación a 37±1°C durante 16 ±1 hora.

- b) Enriquecimiento en medio 2

Tomar 10 µl de la muestra pre enriquecida e incubar a 41,5 °C ± 1°C durante 7 horas ± 1 hora.

- c) Lectura

Añadir a un tubo eppendorf 1 gota de solución reacción y a continuación una gota del medio de enriquecimiento con la muestra utilizando una pipeta Pasteur estéril; agitar en vortex e incubar a 37 °C ± 1°C durante 30 a 60 minutos. Posteriormente, introducir 10 µl en el sensor del lector electromagnético.

#### 2.1.2.-PROTOCOLO

- a) Pre-enriquecimiento

- 1- Preparación de las muestras, en cabina de flujo laminar o, en su defecto, mechero Bunsen.

##### Muestras de alimentación animal

Pesar, con precisión de ± 1%, 25 g de muestra en la duquesa que contiene el medio 1 Soft o en la duquesa que contiene el medio Hard, en el caso de muestras con elevada carga microbiana.

##### Muestras ambientales (soportes, fondos de cajas)

- Soportes:

Se sumerge el soporte en la duquesa que contiene el medio 1 Hard.

- Fondos de caja:

Se recortan para obtener 25 g de muestra, con ayuda de material estéril, y se sumergen en la duquesa que contiene el medio 1 Hard.

##### Muestras alimentos

Pesar, con precisión de ± 1%, 25 g de muestra en la duquesa que contiene el medio 1 Soft.; en el caso de las muestras de carne el medio es medio 1 Hard.

En el caso de alimentos que contienen sustancias inhibidoras, como las especias, la preparación de las muestras se realizará siguiendo las indicaciones de la norma UNE-EN ISO 6887-4: 2003

"Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Preparación de las Página 4 de 43

muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 4: Reglas específicas para la preparación de productos distintos a la leche y producto lácteos, carne y producto cárnicos y, pescados y productos de la pesca”.

2. Una vez preparadas las muestras según se ha indicado en el punto 1, se procede de igual manera para todas ellas.

Agitar manualmente la duquesa que contiene la muestra y el medio de pre enriquecimiento, en horizontal.

Incubar la muestra a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas  $\pm 1$  hora.

b) Enriquecimiento en medio 2

Esperar a que el medio de enriquecimiento alcance la temperatura ambiente (entre  $18$  y  $25^{\circ}\text{C}$ ) antes de utilizarlo.

Se saca la muestra del incubador y se agita la duquesa horizontalmente de forma manual. Se toma  $1$  ml, con pipeta pasteur y se lleva a un tubo de eppendorf estéril. Se agita en vortex.

Se toman del tubo anterior  $10\ \mu\text{l}$ , con micropipeta fija, y se llevan al medio 2. Agitar en vortex.

Incubar a  $41,5\ ^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 7 horas  $\pm 1$  hora, en incubador con agitación iMICROQ.

c) Reacción para su lectura

Espere a que la solución de reacción alcance la temperatura ambiente (entre  $18^{\circ}\text{C}$  y  $25^{\circ}\text{C}$ ) antes de utilizarlos.

Adicionar a un tubo eppendorf una gota de la disolución de reacción y una gota del medio de enriquecimiento con la muestra utilizando una pipeta Pasteur estéril, agitar en vortex e incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 30 a 60 minutos en el incubador con agitación iMICROQ. En el caso de que la solución de reacción sea concetrada, se adiciona una gota de la solución de reacción al eppendorf que contiene en medio 2.

Se saca el eppendorf del incubador con agitación y se toman  $10\ \mu\text{l}$  con micropipeta fija y se depositan en el sensor, previamente atemperado, que anteriormente se ha fijado en el lector electrónico. Se procede a la lectura presionando la tecla start.

En el caso de que el resultado indicado por el lector sea Positivo, se procede a tomar, con asa de siembra, del mismo tubo eppendorf y se siembra en placa con dos medios selectivos: XLD y ASAP.

d) Expresión de los resultados

Se considerará PRESENCIA de *Salmonella* spp. en la porción para análisis (especificando la masa en gramos, de la muestra analizada o superficie muestreada), cuando:

El sensor electroquímico indique: Positivo

Nota: si el sensor indica "retest" se procederá a realizar la medida de nuevo con otro sensor con la muestra sobrante del eppendorf, considerándose la segunda lectura como definitiva.

Un resultado con un valor del test Positivo indica que la muestra está contaminada presuntivamente con *Salmonella* spp.

En este caso se deberá proceder a la confirmación del resultado.

Se considerará AUSENCIA de *Salmonella* spp. en la porción para análisis (especificando la masa en gramos, de la muestra analizada o superficie muestreada), cuando:

El lector electroquímico indique: Negativo

Un resultado con un valor del test Negativo indica que la muestra no contiene *Salmonella* spp. a una concentración inferior al límite de detección.

## e) Confirmación de resultados positivos

Todos los resultados positivos del método Easy QFast® *Salmonella* spp. deben ser confirmados.

La confirmación debe realizarse empleando el líquido de reacción previo a la lectura y debe iniciarse a continuación de la lectura. Aislarse en placas específicas, como por ejemplo XLD y ASAP. Incubar las placas a 37°C durante 24 horas. Confirme las colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas y/o serológicas adecuadas.

## **2.2.- PRINCIPIO Y PROTOCOLO DEL MÉTODO ALTERNATIVO PARA LAS MUESTRAS VETERINARIAS QFast® *Salmonella* veterinaria**

### **2.2.1-PRINCIPIO**

#### a) Primera etapa de pre-enriquecimiento en medio líquido (medio 1 Hard)

Añadir a 225 ml de medio de pre-enriquecimiento a la cantidad de muestra adecuada (1) e incubación a 37±1°C durante 17 horas ±1 hora.

(1)

#### Muestras de heces y cuellos

Pesar, con precisión de ± 1%, 25 g de muestra en la duquesa que contiene 225 ml de medio 1 Hard.

#### Calzas

Añadir a la duquesa que contiene 225 ml de medio 1 Hard, el número de calzas que proceda.

#### b) Segunda etapa de pre-enriquecimiento en medio líquido (medio 1-P)

Tomar 100 µl de la muestra pre enriquecida de medio 1 y añadir en 1ml de agua de peptona tamponada. Incubar a 41,5 °C ± 1°C durante 7 horas ± 1 hora.

d) Enriquecimiento selectivo en medio 2

Añadir 10  $\mu\text{l}$  del agua de peptona tamponada a 1 ml de medio 2. Incubar a  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 17 horas  $\pm 1$  hora.

e) Añadir 1 gota de solución reacción EASY al medio de enriquecimiento con la muestra; agitar manualmente e incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 30 a 60 minutos. Posteriormente, introducir 10  $\mu\text{l}$  en el sensor del lector electromagnético.”

## 2.2.2-PROTOCOLO

a) Primera etapa de pre-enriquecimiento en medio líquido (medio 1 Hard)

1.- Atemperar el medio de pre-enriquecimiento hasta que alcance la temperatura ambiente (entre 18 y  $25^{\circ}\text{C}$ ) antes de utilizarlo.

2.- Adicionar 1 ml de suplemento para el medio 1 Hard en el recipiente que contiene dicho medio.

3.- Pesar 25 g  $\pm 1\%$  de muestra (o añadir los pares de calzas necesarios) en el recipiente que contiene el medio 1 hard previamente suplementado.

4.- Agitar manualmente el recipiente que contiene la muestra y el medio de pre-enriquecimiento, vigorosamente en horizontal manteniendo siempre el tapón hacia arriba y convenientemente cerrado.

5.- Incubar la muestra a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $16 \pm 1$  horas.

La muestra incubada puede ser refrigerada (entre 2 y  $8^{\circ}\text{C}$ ) durante 24 horas o 48 horas, a excepción de las calzas.

b) Segunda etapa de pre-enriquecimiento en medio (medio 1-P)

1.- Añadir 1 ml del medio (medio 1-P) en un tubo eppendorf y esperar a que el medio alcance la temperatura ambiente (entre 18 y  $25^{\circ}\text{C}$ ) antes de utilizarlo.

2.- Sacar el recipiente que contiene la muestra y el medio 1 hasrd del incubador, agitar horizontalmente de forma manual.

3.-Tomar del recipiente anterior 100  $\mu\text{l}$ , con micropipeta, y llevarlos al tubo eppendorf que contiene el MEDIO 1-P. Agitar manulamente e incubar a  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 7 horas  $\pm 1$  hora, en incubador con agitación iMiCROQ.

NOTA: En caso que por la naturaleza de la muestra, debido a presencia de espuma o partículas en suspensión o dificultad para tomar con micropipeta los 100  $\mu\text{l}$  del recipiente obtenido en el punto b)3, tomar de manera estéril 1 ml del recipiente obtenido en el punto b)2 y depositarlo en un recipiente estéril, agitar manualmente. A continuación, seguir las instrucciones del punto b).3.

c) Enriquecimiento en medio líquido selectivo (medio 2)

1.- Esperar a que el medio de enriquecimiento alcance la temperatura ambiente (entre 18 y  $25^{\circ}\text{C}$ ) antes de utilizarlo.

2.- Añadir en condiciones estériles 1mL de medio 2 en un tubo eppendorf.

3.- Sacar el tubo eppendorf que contiene la muestra con el segundo medio de pre-enriquecimiento

(MEDIO 1-P) del incubador.

4.- Tomar del tubo anterior 10 µl, con micropipeta, y llevarlos al medio 2. Agitar manualmente. Incubar a 41,5 °C ± 1 °C durante 18 ± 1 horas, en incubador con agitación iMiCROQ.

d) Reacción y lectura

1.- Esperar a que la solución de reacción (reaction solution easy) y el sensor alcancen la temperatura ambiente (entre 18 y 25 °C) antes de utilizarlos.

2.- Adicionar en el tubo que contiene la muestra después de la incubación en el punto c)4 una gota de reaction solution easy, agitar manualmente e incubar a 37°C ± 1 °C durante 30 minutos en el incubador con agitación iMiCROQ.

3.- Sacar la gradilla de tubos del incubador, tomar 10 µl con micropipeta y depositarlos en el sensor que anteriormente ha fijado en el lector electrónico y escrito el nombre de la muestra. Proceda a la lectura presionando la tecla start.

e) Expresión de los resultados

Se considerará PRESENCIA de *Salmonella spp.* en la porción para análisis (especificando la masa en gramos de la muestra analizada o pares de calzas), cuando:

El sensor electroquímico indique: "POSITIVE"

Un resultado con un valor del test Positivo indica que la muestra está presuntamente contaminada con *Salmonella spp.*

Nota: si el sensor indica "RETEST SAMPLE" se procederá a repetir desde el punto d)3 considerándose la segunda lectura como definitiva.

Se considerará AUSENCIA de *Salmonella spp.* en la porción para análisis (especificando la masa en gramos de la muestra analizada o superficie muestreada o pares de calzas), cuando:

El lector electroquímico indique: "NEGATIVE"

Un resultado con un valor del test Negativo indica que la muestra no contiene *Salmonella spp.*, o que contiene *Salmonella spp.* a una concentración inferior al límite de detección.

f) Confirmación de los resultados positivos

Todos los resultados positivos del método EASY QFast® *Salmonella* veterinaria deben ser confirmados.

La confirmación debe realizarse empleando el líquido de reacción previo a la lectura (obtenido en el apartado d)3. y debe iniciarse a continuación de la lectura. Aislar en placas específicas, como por ejemplo XLD y ASAP. Incube las placas a 37°C durante 24 horas. Confirme las colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas y/o serológicas adecuadas.

## **Conservación de los medios de enriquecimiento y de los reactivos del método EASY QFast®**

Medio 1: medio de pre enriquecimiento (HARD):

- Presentación en duquesas con 225 ml del medio con suplemento. Conservación entre 2 y 8 °C. Caducidad 15 meses desde su fabricación.
- Presentación en duquesas con 225 ml del medio sin suplemento. Conservación entre 2 y 8 °C. Caducidad 15 meses desde su fabricación.
- Presentación en bote de medio de preenriquecimiento deshidratado sin suplemento. Conservación entre 4 y 30 °C. Caducidad 3 años desde su fabricación.
- Suplemento medio 1 en envase de vidrio con gotero. Conservación entre 4 y 30 °C. Caducidad 15 meses desde su fabricación.

Medio 1: medio de pre enriquecimiento (SOFT):

- Presentación en duquesas con 225 ml del medio con suplemento. Conservación entre 2 y 8 °C. Caducidad 15 meses desde su fabricación.
- Presentación en bote de medio de preenriquecimiento deshidratado sin suplemento. Conservación entre 4 y 30 °C. Caducidad 3 años desde su fabricación.
- Suplemento medio 1 en envase de vidrio con gotero (para el formato deshidratado). Conservación entre 4 y 30 °C. Caducidad 1 año desde su fabricación.

Medio 1-P: medio de pre enriquecimiento

- Presentación en duquesas con 225 ml del medio con suplemento. Conservación entre 2 y 8 °C. Caducidad 15 meses desde su fabricación.
- Presentación bote de medio de preenriquecimiento deshidratado sin suplemento. Conservación entre 4 y 30 °C. Caducidad 3 años desde su fabricación.

Medio 2: medio de enriquecimiento

- Presentación en tubos eppendorf con 1 ml del medio. Conservación entre 2 y 8 °C. Caducidad 15 meses desde su fabricación.
- Presentación deshidratado en bolsas de aluminio 2,8 g. Conservación entre 4 y 30 °C. Caducidad tres años desde su fabricación.

Solución de reacción:

- Presentación en bote de 5 ml con gotero. Conservación entre -21 y -5°C. Caducidad un año desde su fabricación.
- Presentación de dos botes de 3 ml con gotero; uno con la solución de reacción deshidratada y otro con la solución diluyente. Conservación entre -21 y -5°C. Caducidad un año desde su fabricación.

Sensor: presentación en envase de plástico con silicagel. Conservación entre 2 y 8 °C. Caducidad un año desde su fabricación.

A continuación se presenta un resumen de la descripción del método junto con el campo de aplicación y el método de referencia correspondiente.

Tabla 1: Descripción del método junto con el campo de aplicación y método

<b>Descripción</b>	<b>Campo de aplicación</b>	<b>Método de referencia</b>
Método alternativo EASY QFast® HARD para la detección rápida de <i>Salmonella</i> spp	Muestras ambientales procedentes de producción primaria (avícola) Carnes Muestras de alimentación animal	Norma UNE-EN ISO 6579:2003/A1:2007 Norma UNE-EN ISO 6579:2003
Método alternativo EASY QFast® Veterinaria HARD para detección rápida de <i>Salmonella</i> spp	Muestras veterinarias	Norma UNE-EN ISO 6579:2003/A1:2007
Método alternativo EASY QFast® SOFT para la detección rápida de <i>Salmonella</i> spp	Muestras de alimentos excepto carnes Muestras de alimentación animal	Norma UNE-EN ISO 6579:2003

## 2.3.- MÉTODOS DE REFERENCIA

Los métodos de referencia son los siguientes:

- Norma UNE-EN ISO 6579 (2003): Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.
- Norma UNE-EN ISO 6579 (2003). Erratum: 2007 V2. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.
- Norma UNE-EN ISO 6579/A1 (2007): Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Modificación 1: Anexo D: Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria.

## 3.- ESTUDIO DE COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS

### 3.1.- EFICACIA RELATIVA, ESPECIFICIDAD RELATIVA Y SENSIBILIDAD RELATIVA

#### 3.1.1 Matrices en las que se ha realizado la validación

En la tabla 2 se establece la distribución de las muestras por categoría.

Tabla 2- Distribución de muestras por categorías

Categorías	Muestras positivas (1)	Muestras negativas	Total
Ambientales (soporte Polvo y fondos)	40	30	70
Alimentación animal (maíz, centeno y soja)	69	60	129
Alimentos (lácteos, frutas y hortalizas y otros, cárnicos)	163	118	281
Veterinarias	76	36	112
TOTAL	348	244	592

(1)Muestras positivas por uno u otro método

### 3.1.2 Muestras naturales con *Salmonella* spp.

Las muestras naturalmente contaminadas con *Salmonella* spp. evaluadas han sido: 31 lo que supone un 8,9 %.

Cuando no ha sido posible conseguir un número suficiente de muestras naturales con *Salmonella* spp., se ha recurrido a la inoculación de las muestras naturales, tal como se recoge en la UNE-EN ISO 16140.

Siguiendo las indicaciones de la UNE-EN ISO 16140, previo a la inoculación de las muestras naturales se ha procedido a estresar las cepas.

### 3.1.3 Preparación de la muestra para análisis

La UNE-EN ISO 16140 establece al respecto que el método de referencia y el alternativo a validar deben ser realizados, siempre que sea posible, con la misma muestra. En este caso no es posible y se ha procedido según se describe en el segundo caso del punto 5.1.1.2.3 de la UNE-EN ISO 16140.

### 3.1.4 Resultados de los ensayos

En las tablas siguientes se recogen los resultados emparejados del método de referencia y alternativo; a partir de ellos se calculan los parámetros sensibilidad relativa (SE), especificidad relativa (SP) y eficacia relativa (AC).

A continuación figuran las definiciones de cada abreviatura:

A+ = Número total de resultados positivos por el método alternativo

A - = Número total de resultados negativos por el método alternativo

R+ = Número total de resultados positivos por el método de referencia

R - = Número total de resultados negativos por el método de referencia

PA = Concordancia de resultados positivos

NA = Concordancia de resultados negativos

PD = Desviación positiva

ND = Desviación negativa

En las tablas que figuran a continuación se recogen los resultados por cada matriz en la que se ha realizado la validación, resultados agrupados por categoría y resultados globales.

Tabla 3- Resultados globales

Todas las matrices		Método ISO 6579 e ISO 6579/A1	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=300</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=22</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=28</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA=242</b>

## CATEGORÍA 1: MUESTRAS DE ALIMENTACIÓN ANIMAL

Tabla 4- Resultados de la categoría 1: muestras de alimentación animal

Categoría 1: Alimentación Animal		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA= 59</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD= 8</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND= 4</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA= 58</b>

Tabla 5- Resultados en maíz con el medio 1 SOFT

Maíz		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=10</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=2</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=2</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA=10</b>

Tabla 6- Resultados en cebada con el medio 1 SOFT

Cebada		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=10</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=3</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=1</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA=10</b>

Tabla 7- Resultados en soja con el medio 1 SOFT

Soja		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=9</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=1</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=1</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA=10</b>

Tabla 8- Resultados en maíz con el medio 1 HARD

Maíz		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=10</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=2</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=0</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA=8</b>

Tabla 9- Resultados en cebada con el medio 1 HARD

Cebada		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=10</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=0</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=0</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA=10</b>

Tabla 10- Resultados en soja con el medio 1 HARD

Soja		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=10</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=0</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=0</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA=10</b>

## CATEGORÍA 2: MUESTRAS DE AMBIENTALES

Tabla 11- Resultados de la categoría 2: muestras ambientales

Categoría 2: Muestras ambientales		Método UNE-EN ISO 6579/A1	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA= 38</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD= 0</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND= 2</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA= 30</b>

Tabla 12- Resultados en soporte esponja

Soporte Polvo		Método UNE-EN ISO 6579/A1	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=23</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=0</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=2</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA=15</b>

Tabla 13- Resultados en fondos de caja

Fondos de caja		Método UNE-EN ISO 6579/A1	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=15</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=0</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=0</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA=15</b>

## CATEGORÍA 3: MUESTRAS DE ALIMENTOS

Tabla 14- Resultados de la categoría 3: muestras de alimentos

Categoría 3: Muestras de alimentos		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA= 135</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD= 8</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND= 20</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA= 118</b>

Tabla 15- Resultados en Productos lácteos

Productos lácteos		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=37</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=0</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=0</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA=30</b>

Tabla 16- Resultados en Vegetales

Frutas y hortalizas		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=37</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=0</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=7</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA=30</b>

Tabla 17- Resultados en Productos varios

Productos varios (Especias, huevo, mahonesa)		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=32</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=0</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=5</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA=30</b>

Tabla 18- Resultados en Carnes

Carnes		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA= 29</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD= 8</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND= 8</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA= 28</b>

## CATEGORÍA 4: MUESTRAS VETERINARIAS

Tabla 19- Resultados de la categoría 4: muestras veterinarias

Muestras veterinarias		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
EASY Qfast® veterinaria	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA= 68</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD= 6</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND= 2</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA= 36</b>

Tabla 20- Resultados de heces

Heces		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R+)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=19</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=0</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=1</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA= 12</b>

Tabla 21- Resultados de calzas

Calzas		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R+)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=29</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=6</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=1</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA= 12</b>

Tabla 22- Resultados de cuellos

Cuellos		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R+)
EASY Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) <b>PA=20</b>	Desviación positiva (R-/A+) <b>PD=0</b>
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) <b>ND=0</b>	Concordancia de negativos (R-/A-) <b>NA= 12</b>

### 3.1.5 Cálculo e interpretación de los resultados e Intervalos de confianza

Cálculo de la eficacia relativa (AC), especificidad relativa (SP) y sensibilidad relativa (SE).

Los resultados de la validación se recogen en la tabla 23.

Tabla 23- Resultados de eficacia relativa (AC), especificidad relativa (SP) y sensibilidad relativa (SE) de la

	NA	ND	PA	PD	Total general	Eficacia	Especificidad	Sensibilidad
<b>Alimentación animal</b>	<b>58</b>	<b>4</b>	<b>59</b>	<b>8</b>	<b>129</b>	90,70%	87,88%	93,65%
<b>Alimentos</b>	<b>118</b>	<b>20</b>	<b>135</b>	<b>8</b>	<b>281</b>	90,04%	93,65%	87,10%
<b>Muestras ambientales</b>	<b>30</b>	<b>2</b>	<b>38</b>	<b>0</b>	<b>70</b>	100,00%	100,00%	95,00%
<b>Muestras veterinarias</b>	<b>36</b>	<b>2</b>	<b>68</b>	<b>6</b>	<b>112</b>	92,86%	85,71%	97,14%
<b>Total general</b>	<b>242</b>	<b>28</b>	<b>300</b>	<b>22</b>	<b>592</b>	<b>91,55%</b>	<b>91,67%</b>	<b>91,46%</b>

En la tabla 24 se muestran los resultados obtenidos de AC, SP y SE (%) para todas las categorías con su respectivo límite de confianza inferior (LCL) de la ampliación.

Tabla 24- Resultados de AC, SP y SE con su límite de confianza inferior

Método de referencia UNE-EN ISO 6579 ó UNE-EN ISO 6579/A1 // Método Easy Qfast®										
Matrices		AC (%)	LCL	LCS	SP (%)	LCL	LCS	SE (%)	LCL	LCS
<b>Categoría 1.</b> Alimentación animal		90,70	85,40	-	87,88	80,02	95,74	93,65	88,82	-
<b>Categoría 2.</b> Muestras ambientales		100,00	-	-	100,00	-	-	95,00	92,50	-
<b>Categoría 3.</b> Alimentos		90,04	84,03	-	93,65	88,82	-	87,10	75,25	98,95
<b>Catería 4.</b> Muestras veterinarias		92,86	88,43	-	85,71	81,40	90,02	97,14	94,70	
<b>Todas las categorías</b>		<b>91,55</b>	<b>87,10</b>		<b>91,67</b>	<b>87,34</b>	-	<b>91,46</b>	<b>89,92</b>	

### Test estadístico según el anexo F de la norma UNE-EN ISO 16140: 2003

La prueba empleada para el estudio de resultados discordantes es:

Tras contar el número total de resultados discordantes de Y de la manera siguiente:

$$Y = PD + ND$$

Se comprueba si los dos métodos podrían ser diferentes por el balance de la sensibilidad frente a la especificidad:

- Para  $Y < 6$ , menos de 6 resultados discordantes no hay disponible ninguna prueba.

- Para  $6 \leq Y \geq 22$ , entre 6 y 22 resultados discordantes, se determina  $m$  como el valor más pequeño de los dos valores PD y de ND y se emplea la ley binomial conforme a la siguiente tabla 25:
- Si  $m \geq M$  para una  $Y$  dada, los dos métodos son diferentes a  $\alpha < 0,05$  (bilateral).

Tabla 25- Tabla Anexo F UNE-EN ISO 16140: 2003

Valores discordantes $Y = PD + ND$	6 a 8	9 a 11	12 a 14	15 a 16	17 a 19	20 a 22
$M = \max(m)$ para $\alpha < 0,05$	0	1	2	3	4	5

- Para  $Y > 22$ , más de 22 resultados discordantes, se emplea el test de McNemar con la distribución chi-cuadrado para 1 grado de libertad:

$$X^2 = d^2/Y, \text{ con } d = |PD - ND| \text{ e } Y = PD + ND$$

Los dos métodos son diferentes para  $\alpha < 0,05$  (bilateral) si  $X^2 > 3,841$

En el estudio realizado se han encontrado 50 discordantes por lo que hay que realizar el test de McNemar.

Los resultados del test estadístico obtenidos se representan a continuación:

$$d = |PD - ND| = |22 - 28| = 6; \quad d^2 = 36$$

$$Y = PD + ND = 22 + 28 = 50$$

$$X^2 = d^2/Y = 36/50 = 0.72 \rightarrow X^2 < 3,841 \rightarrow \text{Los métodos no son diferentes.}$$

### 3.1.6 Estudio de los resultados discordantes

#### **Desviaciones negativas (ND)**

En relación a las desviaciones negativas se han obtenido 28; la información sobre dichas muestras figura en la tabla 26.

Tabla 26- Resultados discordantes obtenidos: desviaciones negativas

Nº muestra	Matriz	Resultado Easy Qfast	Lectura sensor	XLD	ASAP	Resultado ISO 6579/A1 ó ISO 6579
1297	Paletilla de cordero	Ausencia/ 25 g	466 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
1314	Chuletillas	Ausencia/ 25 g	447 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
1315	Chuletillas falda	Ausencia/ 25 g	378 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
1316	Paletilla de cordero	Ausencia/ 25 g	837 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
1228	Chuleta de lomo de cerdo	Ausencia/ 25 g	487 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
1273	Chuleta de cerdo	Ausencia/ 25 g	650 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
1274	Chuleta de cerdo	Ausencia/ 25 g	485 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
1308	Estofado de cerdo	Ausencia/ 25 g	743 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
496	Ajo en polvo	Ausencia/ 25 g	620 nA	Negativo	Negativo	Presencia/ 25 g
497	Ajo en polvo	Ausencia/ 25 g	648 nA	Negativo	Negativo	Presencia/ 25 g
498	Orégano	Ausencia/ 25 g	378 nA	Negativo	Negativo	Presencia/ 25 g
503	Tabasco	Ausencia/ 25 g	446 nA	Negativo	Negativo	Presencia/ 25 g
504	Tabasco	Ausencia/ 25 g	354 nA	Negativo	Negativo	Presencia/ 25 g
449	Ensalada gourmet	Ausencia/ 25 g	571 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
452	Ensalada mezclum	Ausencia/ 25 g	727 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
741	Uva tinta	Ausencia/ 25 g	444 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
742	Uva tinta	Ausencia/ 25 g	282 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
745	Pera	Ausencia/ 25 g	617 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
458	Zumo de manzana	Ausencia/ 25 g	739 nA	Positivo	Negativo	Presencia/ 25 g
510	Zumo de manzana	Ausencia/ 25 g	639 nA	Positivo	Negativo	Presencia/ 25 g
560	Soporte polvo esponja	Ausencia/ soporte	372 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ soporte
562	Soporte polvo esponja	Ausencia/ soporte	221 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ soporte
354	Soja	Ausencia/ 25 g	383 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
369	Cebada	Ausencia/ 25 g	485 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
344	Maíz	Ausencia/ 25 g	377 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
345	Maíz	Ausencia/ 25 g	553 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
1506	Heces	Ausencia/ 25 g	167 nA	Positivo (1 colonia)	Negativo	Presencia/25g
1562	Calzas	Ausencia/ 25 g	error/546 nA	Negativo	Negativo	Presencia/4 calzas

nA: nanoamperios

## Comentarios:

Las ocho muestras de carne indicadas con desviaciones negativas, se presentaban envasadas en atmósfera modificada, lo que minimiza la proliferación de la carga microbiana. En este tipo de muestras, con carga microbiana no excesivamente alta, en las que se emplea el medio hard como pre-enriquecimiento, la *Salmonella spp.* puede quedar metabólicamente inactiva por el potente efecto inhibidor del medio. Esto provocaría que la reacción enzimática no se produzca en el momento de la lectura en el sensor, dando una lectura negativa pero produciéndose posteriormente el crecimiento de *Salmonella spp.* en las placas de XLD y ASAP.

En las dos muestras de especia tabasco (503 y 504), las dos muestras de ajo en polvo (496 y 497) y orégano (498) no se han obtenido crecimientos de colonias características de *Salmonella spp.*, en ninguna de las dos placas de confirmación; ambas muestras se inocularon empleando la cepa (CV14), esta cepa se utilizó en el estudio de inclusividad, siendo satisfactorio.

La especia Chile Tabasco, el ajo y el orégano, presentan sustancias naturales con efectos antimicrobianos. La norma UNE-EN ISO 6887-4: 2003 "Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico" establece que la preparación de las muestras de especias para su posterior análisis microbiológico por métodos ISO, requiere la adición de sulfato de potasio al diluyente agua de peptona (APT) con el fin de disminuir la actividad antimicrobiana de sustancias inhibidoras que contienen este tipo de matrices. Dicha adición se realizó en las muestras de especias para su posterior análisis por el método de referencia pero no para las muestras analizadas por el método alternativo. Esto explica que en estas muestras por el método alternativo se hayan obtenido falsos negativos. A raíz de dichos resultados el protocolo del método debe incluir que para el caso de este tipo de muestras su preparación se realizará siguiendo las indicaciones de la norma UNE-EN ISO 6887-4.

En las dos muestras ambientales (560, 562) hubo muy bajo crecimiento de colonias características de *Salmonella spp.* en las dos placas; tras las confirmaciones bioquímicas y serológicas correspondientes se confirmó que eran *Salmonella spp.* Las muestras se inocularon con 2,7 ufc/ soporte polvo esponja, las características de esta matriz no permiten asegurar la homogeneidad de la contaminación a niveles tan bajos. Por ello, se determina que la cantidad del microorganismo en el momento de la lectura no fue suficiente para que el lector lo detectara y sí, para que 24 horas más tarde, tras la incubación a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$  C, el microorganismo se pusiese de manifiesto en las placas de XLD y ASAP.

En el caso de las muestras de alimentación animal (344, 345, 354, 369), la lectura se ha realizado tras incubar 30 minutos la muestra con las solución de reacción. Tras obtener dichas desviaciones negativas, se reincubaron otros 30 minutos dichas muestras y se procedió de nuevo a la lectura, indicando el sensor presencia; en base a ello, se recomienda que se llegue al límite superior del tiempo de incubación establecido en esta etapa del método.

En el caso de las dos muestras de uvas tintas, el lector ha dado una respuesta de ausencia y, sin embargo ha habido crecimiento de colonias características tanto en la placa de XLD como de ASAP. Las uvas tintas presentan polifenoles, sustancias cuyo efecto antimicrobiano está recogido en la bibliografía. El crecimiento de *Salmonella spp.* ha podido verse afectado por dicho efecto antimicrobiano, siendo menor de lo esperado tras el desarrollo del procedimiento de ensayo alternativo y no llegando al valor umbral requerido para que el lector de una respuesta positiva, pero produciéndose posteriormente el crecimiento de *Salmonella spp.* en las placas de XLD y ASAP.

En las muestras de IV gama (ensaladas envasadas en atmósfera modificada) la presencia de *Salmonella spp.* era natural; la cantidad de *Salmonella spp.* en el momento de la lectura probablemente haya sido inferior al valor umbral requerido para que el lector de una respuesta positiva, pero produciéndose posteriormente el crecimiento de *Salmonella spp.* en las placas de XLD y ASAP.

En el presente estudio se han analizado 12 zumos de manzana inoculados con *Salmonella spp.* en tres días diferentes, de los cuales dos de ellos no han dado el resultado esperado. El zumo de manzana presenta un pH ácido (alrededor de 3,5), no siendo las condiciones más adecuadas para la proliferación microbiana; un insuficiente dopaje en las dos muestras combinado con el bajo pH que presentan ha podido ocasionar el resultado negativo al no haber una cantidad suficiente de *Salmonella spp.* a la hora de la lectura.

Por último, se ha obtenido un falso negativo en una muestra de pera, creciendo colonias características en ambas placas. El dopaje de dicha muestra ha sido más bajo de lo esperado a través del control del inóculo lo que ha dado lugar a esta desviación; en las placas de XLD y ASAP ha habido crecimiento, lo que ha sucedido también en el estudio del límite de detección relativa en los niveles comprendidos entre 0,5 y 2 UFC/ 25 g.

En la muestra de heces se detecta que hay un bajo crecimiento de *Salmonella spp.* puesto que solo se ha obtenido una colonia característica en la placa de XLD. La ausencia de crecimiento de colonias características en el medio cromogénico ASAP indica la baja concentración de *Salmonella* inoculada en la muestra, lo que da lugar a un resultado negativo en el medio alternativo. La discordancia entre ambos métodos es debido a que el análisis se ha realizado en dos porciones diferentes de muestra. Lo mismo ha ocurrido con la muestra de calzas en la cual no se ha detectado crecimiento de colonias características en ninguna de las dos placas.

## DESVIACIONES POSITIVAS

En relación a las desviaciones positivas se han obtenido 22; la información sobre dichas muestras figura en la tabla 27.

Tabla 27- Resultados discordantes obtenidos: desviaciones positivas

Nº muestra	Matriz	Resultado Easy Qfast	Lectura sensor	XLD	ASAP	Resultado ISO 6579
1027	Carne picada de cerdo	Presencia/25g	1020Rt/1209 nA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
1285	Morcillo de vacuno	Presencia/25g	1491 nA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
1209	Filete de vacuno	Presencia/25g	1,68 uA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
1212	Filete de cordero	Presencia/25g	1,16 uA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
1213	Filete de cerdo	Presencia/25g	1446 nA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
1023	Carne picada de vacuno	Presencia/25g	940rt/1025rt nA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
1026	Carne picada de vacuno	Presencia/25g	1310 nA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
1028	Carne picada de cerdo	Presencia/25g	1437 nA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
529	Pienso a base de soja	Presencia/25g	1,91 uA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
373	Pienso a base de maíz	Presencia/25g	1368 nA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
375	Pienso a base de maíz	Presencia/25g	4,88 uA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
523	Pienso a base de cebada	Presencia/25g	2,30 uA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
524	Pienso a base de cebada	Presencia/25g	4,56 uA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
531	Pienso a base de cebada	Presencia/25g	5,25 uA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
1413	Maiz	Presencia/ 25 g	1341 nA	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
1416	Maiz	Presencia/ 25 g	956rt/872 rt	Negativo	Negativo	Ausencia/25g
1685	Calzas	Presencia/ 4 calzas	1,86 uA	Positivo	Negativo	Ausencia/ 4 calzas
1686	Calzas	Presencia/ 4 calzas	2,66 uA	Positivo	Negativo	Ausencia/ 4 calzas
1687	Calzas	Presencia/ 4 calzas	2,54 uA	Positivo	Positivo	Ausencia/ 4 calzas
1688	Calzas	Presencia/ 4 calzas	3,25 uA	Positivo	Positivo	Ausencia/ 4 calzas
1692	Calzas	Presencia/ 4 calzas	3,56 uA	Positivo	Positivo	Ausencia/ 4 calzas
1693	Calzas	Presencia/ 4 calzas	3,10 uA	Positivo	Positivo	Ausencia/ 4 calzas

uA : microamperios

nA: nanoamperios

### Comentarios:

En relación a las desviaciones positivas que se han obtenido en las muestras, no ha habido crecimiento de colonias características ni en XLD ni ASAP; no obstante, se procedió a la identificación de las colonias presentes en ambas placas mediante la galería bioquímica API 20E.

Se identificaron en una serie de muestras *Enterobacter cloacae* y/o *Hafnia alvei*. En el estudio de exclusividad se analizó la cepa de colección *Enterobacter cloacae* (CECT 194) y *Hafnia alvei* (CECT 157), la

cuales presentaron ausencia tanto en el medio soft como hard. En este caso las cepas identificadas en ambos medios son cepas salvajes presentes de forma natural en las muestras analizadas; puede ser que en este caso las cepas salvajes se hayan comportado de forma diferente a las cepas de colección. En otras muestras la identificación dio lugar a microorganismos como *Cronobacter* spp., *Enterobacter aurigenes*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter coseri* o *farmeri*, *Klebsiella pneumoniae*.

En todas las muestras en las que se obtuvieron desviaciones positivas, tras la confirmación obligatoria se concluyó un resultado presunto positivo negativo confirmado.

En el caso de las calzas las desviaciones positivas se deben a que el método de referencia ISO 6579-A1 no ha detectado la presencia de *Salmonella* spp.

### **3.2.- LÍMITE DE DETECCIÓN RELATIVO (LDR)**

El nivel de detección relativa se corresponde con el menor número de microorganismos cultivables que pueden ser detectados en la muestra, con una probabilidad de 50%, mediante los dos métodos, alternativo y de referencia. Las contaminaciones artificiales se realizaron de acuerdo a los requisitos de la norma UNE-EN ISO 16140, ya descritos anteriormente.

La determinación del límite de detección relativo se ha realizado en cuatro matrices diferentes, cada una englobada en una categoría. Para cada una de las categorías se emplea un microorganismo diana diferente.

Se han empleado 4 niveles, como mínimo, de microorganismo diana por matriz, incluyendo el control negativo. El análisis se realiza seis veces por ambos métodos, alternativo y de referencia.

La determinación del límite de detección relativo se ha realizado en seis matrices diferentes. Estas matrices así como las cepas de *Salmonella* spp. son:

- Soporte polvo: *Salmonella london*
- Lácteos (leche cruda): *Salmonella dublin*
- Huevos frescos: *Salmonella enteritidis*
- Vegetales (fruta): *Salmonella virchow*
- Maíz: *Salmonella derby*
- Carnes: *Salmonella arizonae*
- Heces: *Salmonella typhimurium*

## 3.2.1 Protocolo de contaminación

La UNE-EN ISO establece al respecto que el método de referencia y el alternativo a validar deben ser realizados, siempre que sea posible, con la misma muestra. En este caso no es posible y se ha procedido según se describe en el segundo caso del punto 5.1.1.2.3 de la UNE-EN ISO 16140.

## 3.2.2 Resultados

Los resultados de límite de detección figuran a continuación, habiéndose calculado según el test de Spearman-Kärber<sup>1</sup>.

1 "Hitchens A. Proposed Use of a 50 % Limit of Detection value in Defining Uncertainty Limits in the Validation of presence-Absence Microbial Detection Methods. Draft 10th December, 2003".

Tabla 28- Estudio límite de detección: Resultados en todas las matrices

Matriz	EASY Qfast® (ufc/25g) o (ufc/soporte)		UNE-EN ISO 6579 o UNE-EN ISO 6579/A1 (ufc/25g) o (ufc/soporte)	
	Límite de detección relativo	Intervalo	Límite de detección relativo	Intervalo
<b>SOPORTE POLVO</b>	0,39	0,16-0,93	0,61	0,27-1,38
<b>HECES</b>	5,13	3,85-6,80	3,13	1,60-6,05
<b>FRUTA</b>	0,8	0,48-1,32	0,22	0,15-0,35
<b>HUEVOS</b>	0,75	0,52-1,10	0,3	0,20-0,50
<b>LECHE CRUDA</b>	0,48	0,28-0,8	0,35	0,28-0,45
<b>CARNE</b>	0,58	0,38-0,90	0,4	0,22-0,72
<b>MAIZ (medio soft)</b>	0,4	0,25-0,62	0,4	0,25-0,62
<b>MAIZ (medio hard)</b>	0,45	0,25-0,8	0,25	0,15-0,40

El método alternativo y el método de referencia presenten límites de detección relativa similares.

En el límite de detección relativo en el método alternativo está comprendido entre 0,16 y 6,80 ufc/25g o soporte y en el caso del método de referencia entre 0,15 y 6,05 ufc/25g o soporte.

### **3.3.- INCLUSIVIDAD Y EXCLUSIVIDAD**

La inclusividad es la capacidad del método alternativo para detectar el analito diana entre un amplio grupo de cepas. El objetivo del estudio es verificar que todas las cepas son detectadas por el método alternativo. Al poseer dos medios de cultivo de pre-enriquecimiento, Soft y Hard, se procede a hacer el estudio para ambos medios.

La exclusividad es la ausencia de interferencia en el método alternativo de un grupo adecuado de cepas no diana. El objetivo del estudio es verificar que las cepas no diana no son detectadas por el método alternativo y así verificar la selectividad del método alternativo. Al igual que la inclusividad se procede a realizar el estudio con ambos medios.

#### **3.3.1 Protocolo de ensayo**

Las cepas elegidas para dicho estudio se encuentran en forma de criobolas, las cuales se dejan crecer en caldo BHI a 37°C durante 24h. Una vez pasado este tiempo se realizan las diluciones decimales correspondientes en maximum recovery diluent (MRD), y se añade a 225 ml del medio correspondiente 0,3 ml de la dilución adecuada. Para controlar el inóculo añadido en la muestra se siembra 1 ml de la dilución correspondiente en 5 placas de PCA y se incuban durante 72h a 30°C.

#### **3.3.2 Resultados y conclusión**

Los resultados de la Inclusividad y exclusividad, tanto en el medio Hard como en el medio Soft, figuran en el Anexo 4 para la Exclusividad y Anexo 5 para la inclusividad.

Los resultados obtenidos son favorables tanto en el medio Hard como en el medio Soft, tanto para la inclusividad como para la exclusividad.

## 4.-ESTUDIOS COLABORATIVOS

### 4.1.- ORGANIZACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio del ejercicio colaborativo se organizó en noviembre y diciembre de 2014. El número de laboratorios participantes fueron 11.

El cronograma del colaborativo fue el que se detalla a continuación:

- 18-21 noviembre 2014: Recepción de las muestras de leche en polvo en el laboratorio
- Semana del 24 de noviembre 2014: inicio ensayos lote A (Muestras M1 a M12)
- Semana del 1 de diciembre 2014: inicio ensayos lote B (Muestras M13 a M24)

No se produjeron incidencias en el cronograma previsto.

#### 4.1.1.-Naturaleza de las preparaciones

Se seleccionó una muestra procedente de un único lote, consistente en leche en polvo desnatada.

Sobre esta muestra se verificó la ausencia de *Salmonella* spp., mediante la aplicación del método de referencia. En estos ensayos no se halló presencia de *Salmonella* spp. en ninguna de las muestras analizadas.

De forma previa a los envíos se prepararon cantidad suficiente de envases de leche en polvo desnatada para permitir la adición de forma previa a la expedición de una cantidad de inóculo de *Salmonella* spp. preparado sobre leche en polvo, obteniendo un peso final de 25 gramos.

## 4.1.2.-Tasa de inoculación

Las muestras se inocularon en tres niveles diferentes:

Tabla 29- Niveles de inóculo de *Salmonella* spp.

Nivel	Recuento medio de <i>Salmonella</i> spp. en 25 g
L0	0
L1	35 ufc
L2	76 ufc

Los inóculos fueron preparados, con la adición de *Salmonella entérica* perteneciente a la CECT 4594.

Las pruebas de estabilidad realizadas durante el periodo de realización del ensayo confirmaron la supervivencia del microorganismo en todas las muestras analizadas que habían sido contaminadas.

## 4.1.3.-Problemas con la temperatura en el transporte y a la hora de la recepción.

Las muestras se codificaron de M1 a M24, recibiendo cada laboratorio dos envases de cada código, empleándose aleatoriamente para su ensayo por el método normativo o por el método alternativo.

Las muestras e inóculos a enviar fueron almacenados en congelación a (-30°C) hasta su expedición, y confirmada su estabilidad de los inóculos cuando éstos se mantienen en refrigeración durante un periodo de 2 semanas.

Las muestras fueron enviadas el 17 de noviembre del 2014, en paquete isotermo con nieve carbónica, y recibidas en todos los laboratorios el 18 de noviembre. Todas las preparaciones llegaron a tiempo.

Los laboratorios debían mantener las muestras en refrigeración hasta comenzar los ensayos de las muestras a partir del 24 de noviembre del 2014 (para las muestras M1 a M12) y el 1 de diciembre el resto de códigos (de M13 a M24).

Los códigos correspondientes a los inóculos y su nivel correspondiente de contaminación fueron los indicados en la Tabla 30:

Nivel de Contaminación	Códigos de muestras
L0	M1, M2, M7, M8, M13, M14, M19, M20
L1	M3, M4, M5, M6, M9, M10, M11, M12
L2	M15, M16, M17, M18, M21, M22, M23, M24

## 4.2.- RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS

El resumen de los resultados obtenidos por los laboratorios se muestra en la tabla 31.

Tabla 31- Coincidencia de resultados para cada uno de los métodos aplicados y nivel.

Laboratorio	Método alternativo			Método de referencia		
	Nº Muestras positivas			Nº Muestras positivas		
	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2
1	0 / 8	8 / 8	7 / 8	1 / 8	8 / 8	8 / 8
2	1 / 8	8 / 8	7 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
3	0 / 8	7 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
4	0 / 8	8 / 8	8 / 8	4 / 8	8 / 8	8 / 8
5	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
6	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
7	0 / 8	7 / 8	7 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
8	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
9	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
10	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
11	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
	FP	TP	TP	FP	TP	TP
	1	86	85	5	88	88
N	88	88	88	88	88	88

FP: Número de falsos positivos

TP: Número de verdaderos positivos

N: Número de análisis realizados en cada nivel

## 4.3.- CÁLCULOS

### 4.3.1.- CÁLCULO DE LOS PORCENTAJES DE ESPECIFICIDAD (SP), SENSIBILIDAD (SE) Y EFICACIA RELATIVA (AC)

Los cálculos de especificidad y sensibilidad de ambos métodos se presentan en la tabla 32, incluyendo el valor crítico inferior (LCL) y el intervalo superior (LCS) e inferior (LCL), para los valores obtenidos inferiores al 90%, según aplique.

Para el nivel 0, L0:

$$SP = \left[ 1 - \left( \frac{FP}{N} \right) \right] * 100 \%$$

Para los niveles L1 y L2:

$$SE = \left( \frac{TP}{N} \right) * 100 \%$$

Tabla 32: Especificidad (SP) y Sensibilidad (SE) del método alternativo y de referencia.

	Método alternativo Easy QFast®	Linf	Método de Referencia UNE-EN ISO 6579	Linf
<b>Especificidad (SP)</b>				
SP (Nivel L0)	98,86%	96,60%	94,32%	89,38%
<b>Sensibilidad (SE)</b>				
SE (Nivel L1)	97,73%	94,55%	100,00%	100,00%
SE (Nivel L2)	96,59%	92,72%	100,00%	100,00%
SE (Nivel L1+L2)	97,16%	94,65%	100,00%	100,00%

## Cálculos de la Exactitud Relativa (AC)

La comparación de los pares de resultados de los diferentes niveles de contaminación se resume en la tabla 33.

Tabla 33: Resultados obtenidos por ambos métodos

Nivel	Método Alternativo <b>Easy QFAST® Salmonella</b>	Método de Referencia <b>UNE-EN ISO 6579</b>		
		Muestras Positivas	Muestras Negativas	Total
Nivel L0	<b>Muestras Positivas</b>	PA= 0	PD= 1	1
	<b>Muestras Negativas</b>	ND= 5	NA= 82	87
	<b>Total</b>	5	83	88
Nivel 1	<b>Muestras Positivas</b>	PA= 86	PD=0	86
	<b>Muestras Negativas</b>	ND= 2	NA= 0	2
	<b>Total</b>	88	0	88
Nivel 2	<b>Muestras Positivas</b>	PA= 85	PD= 0	85
	<b>Muestras Negativas</b>	ND= 3	NA= 0	3
	<b>Total</b>	88	0	88
Nivel 1+2	<b>Muestras Positivas</b>	PA= 171	PD= 0	171
	<b>Muestras Negativas</b>	ND= 5	NA= 0	5
	<b>Total</b>	176	0	176

Nota-PA: concordancias positivas; NA: concordancias negativas; ND: desviaciones negativas; PD desviaciones positivas.

Los valores de la eficacia relativa (AC) para los diferentes niveles de contaminación, se presentan en la tabla 34, junto con el correspondiente límite inferior crítico LCL.

La eficacia relativa se calcula según la siguiente fórmula:

$$AC = \frac{PA + NA}{N} * 100 \%$$

Siendo:

PA: Concordancias de número de positivos

NA: Concordancias de número de negativos

Tabla 34: Valores de Eficacia relativa (AC)

Nivel	Parámetro de evaluación	Resultado
Nivel 0	AC	93,18%
	LCL	87,81%
Nivel 1	AC	97,73%
	LCL	95,55%
Nivel 2	AC	96,59%
	LCL	92,72%
Nivel 1+2	AC	97,16%
	LCL	94,65%

#### 4.3.2.- ESTUDIO DE LOS RESULTADOS DISCORDANTES

##### Test estadístico según el anexo F de la norma UNE-EN ISO 16140

Los resultados del test estadístico obtenidos se representan en la siguiente tabla 35.

		Método de referencia Método alternativo Easy Qfast®
Nivel 0	Y= ND+PD	Y=6
	Conclusión	m valor más pequeño de PD y ND=1 M=0 para Y de 6 a 8 Los métodos se consideran equivalentes (m>M)
Nivel 1	Y= ND+PD	Y=2 (Y<6)
	Conclusión	No se dispone de test estadístico. Los métodos se consideran equivalentes.
Nivel 2	Y= ND+PD	Y=3 (Y<6)
	Conclusión	No se dispone de test estadístico. Los métodos se consideran equivalentes.
Nivel 1 + Nivel 2	Y= ND+PD	Y=5 (Y<6)
	Conclusión	No se dispone de test estadístico. Los métodos se consideran equivalentes.

**El método Easy Qfast® Salmonella y el método de referencia UNE-EN ISO 6579 se consideran equivalentes.**

## 5- INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO COLABORATIVO Y COMPARACIÓN DE MÉTODOS

### 5.1. COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE LA EFICACIA RELATIVA (AC), ESPECIFICIDAD RELATIVA (SP) Y SENSIBILIDAD RELATIVA (SE)

A continuación se recogen en la tabla 36 los resultados obtenidos en el ejercicio colaborativo y en la validación.

Tabla 36: Resultados obtenidos en el ejercicio colaborativo y en la validación

	<b>Estudio colaborativo</b>	<b>Estudio comparativo de los métodos</b>
<b>Eficacia relativa (AC)</b>	93,18%	91,25%
<b>Sensibilidad relativa (SE)</b>	97,16%	89,92%
<b>Especificidad relativa (SP)</b>	98,86%	92,79%

En los datos recogidos en dicha tabla se aprecia que los valores de AC, SE y SP son más altos en el estudio colaborativo que en el estudio comparativo; esto es así ya que los datos de la validación corresponden a un alcance muy amplio (muestras ambientales procedentes de producción primaria, alimentos para animales y muestras de alimentos en general).

### 5.2.- CONFORMIDAD, CONCORDANCIA Y OPORTUNIDAD RELATIVA DE CONCORDANCIA (COR)

La **Conformidad** es la probabilidad porcentual de encontrar el mismo resultado en dos porciones analíticas idénticas (ambas positivas o ambas negativas), en el mismo laboratorio, bajo condiciones de repetibilidad.

Para encontrar este término de los datos obtenidos en un colaborativo, la probabilidad de que dos muestras den el mismo resultado se calcula para cada laboratorio participante. Una vez obtenidas las probabilidades se promedian. Los valores obtenidos se encuentran en la tabla 37.

La **concordancia** es la probabilidad porcentual de encontrar el mismo resultado en dos muestras idénticas analizadas por diferentes laboratorios.

Para su cálculo se toma a su vez cada replicado de cada laboratorio, pareándolo con resultados idénticos del resto de laboratorios. La concordancia es el porcentaje de todos los datos emparejados del mismo resultado sobre todos los pares de datos posibles. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 37.

La **oportunidad relativa de concordancia**: Aunque en un método cualitativo, es difícil calcular el grado de variación colaborativo, al estar la conformidad y la concordancia fuertemente influidas por el grado de eficacia, puede calcularse la llamada oportunidad relativa de concordancia (COR), calculada según la ecuación:

$$COR = \frac{\text{Conformidad} * (1 - \text{Concordancia})}{\text{Concordancia} * (1 - \text{Conformidad})}$$

Si la concordancia es más pequeña que la conformidad, indica que dos muestras idénticas tienen más posibilidades de dar el mismo resultado si son analizadas por el mismo laboratorio que si son analizadas por laboratorios diferentes, sugiriendo que puede haber una variabilidad en el rendimiento entre laboratorios.

### 5.2.1- Conformidad, concordancia y oportunidad relativa de concordancia (COR)

Tabla 37: Resultados de conformidad, concordancia y oportunidad relativa de concordancia

Nivel	Easy QFast® <i>Salmonella</i>			UNE-EN ISO 6579		
	Conformidad	Concordancia	COR	Conformidad	Concordancia	COR
<b>Nivel 0</b>	98,01%	90,40%	5,24	93,47%	100,00%	1,79
<b>Nivel 1</b>	96,02%	95,51%	1,13	100,00%	100,00%	1,00
<b>Nivel 2</b>	94,03%	94,52%	0,91	100,00%	100,00%	1,00

### Conclusiones

Las conclusiones del estudio colaborativo en leche en polvo son las siguientes:

- Sobre los resultados emitidos por los participantes:
  - Para el método normalizado de referencia, sólo dos laboratorios indican haber encontrado *Salmonella* spp. correspondiente al nivel 0, nivel no inoculado. El laboratorio número 1 ha encontrado una muestra positiva de las 8 no inoculadas y el laboratorio número 4, el cual declara 4 positivos en el nivel 0. Sin embargo, ninguno de estos dos laboratorios ha detectado presencia de *Salmonella* spp en el nivel 0 con el método alternativo Easy QFast®. Solamente el laboratorio número 2 ha detectado un positivo en el nivel 0 con el método alternativo Easy QFast®.
  - En el caso de las muestras del nivel 1 y nivel 2 la totalidad de participantes encuentran presencia con el método de referencia. La detección del método alternativo es, así mismo

satisfactoria, aunque con algunos comentarios: el laboratorio número 3 no ha detectado una muestra positiva en el nivel 1 con el método alternativo Easy QFast®. Los participantes número 1 y número 2 reportaron un resultado negativo en el nivel 2 con el método alternativo Easy QFast®. El laboratorio número 7 reportó un negativo en el nivel 1 y otro en el nivel 2.

- La Especificidad del método alternativo es superior al 98% y al valor obtenido por el método de referencia.
- La Sensibilidad, así mismo, se sitúa por encima del 95%, en todos los niveles estudiados, y muy próxima a los valores obtenidos en el método de referencia.
- La conformidad y concordancia del método alternativo Easy QFast®, se sitúa por encima del 90%. No obstante, se detecta que, las diferencias encontradas entre los resultados de las muestras idénticas distribuidas son atribuibles a la variabilidad interlaboratorio, más que al comportamiento del método como indica el factor COR. El elevado valor obtenido para este estadístico en el método alternativo Easy Qfast® de 5,24 responde a la excelente conformidad del método, comparada con la concordancia.

## 6. AUDITORÍAS

### Introducción

AENOR realiza una auditoría anual en la que verifica el mantenimiento del cumplimiento de Los requisitos establecidos en el “Reglamento de certificación de métodos alternativos validados destinados al control de calidad y seguridad alimentaria (RP B 59)”.

Por un lado, se audita el sistema de gestión de calidad en las instalaciones del fabricante con objeto de verificar que se mantienen las condiciones de la concesión establecidas en el Reglamento RP B59.

Po otro lado, se han llevado a cabo ensayos de contraste anual, de manera que a lo largo de los 5 años, el método certificado sea verificado en todas las matrices al menos una vez. Previamente a la auditoría de seguimiento, AENOR prepara una muestra que se divide en dos alícuotas. El auditor facilita al fabricante una de las alícuotas, iniciando el análisis el ensayo de ejecución en presencia del auditor. Una vez finalizado el análisis, se envía el resultado obtenido a AENORlaboratorio. Paralelamente, el laboratorio de AENOR realiza el ensayo en la segunda alícuota. Los resultados serán comparados y da lugar a un informe.

### Resultados de la auditoría

Año 2014

- Auditoría: auditoría superada satisfactoriamente.
- Ensayo de ejecución: matriz túrmix con *Salmonella* spp. adicionada. Resultado correcto.

Año 2015

- Auditoría: auditoría superada satisfactoriamente.
- Ensayo de ejecución: matriz yogur con *Salmonella* spp. adicionada. Resultado correcto.

Año 2016

- Auditoría: auditoría superada satisfactoriamente.
- Ensayo de ejecución: matriz carne fresca con *Salmonella* spp. adicionada. Resultado correcto. Ensayo con Easy QFast medio Hard.
- Ensayo de ejecución: ajo deshidratado sin *Salmonella* spp. adicionada. Resultado correcto. Easy QFast medio Soft.

## 7.- CONCLUSIÓN

### **Las conclusiones del estudio comparativo son:**

El método Easy QFast® presenta una eficacia relativa, especificidad relativa y sensibilidad relativa satisfactoria. En función de los resultados obtenidos se establece que el método Easy QFast® es equivalente al método de referencia. Las mismas conclusiones establecen para el método EasyQFast® veterinaria. Los resultados de los ensayos llevados a cabo en las matrices de cuellos y heces refrigerando a 4-8 °C el medio 1 tras su incubación, durante 24 horas o 48 horas son equivalentes a los obtenidos sin refrigerar dicho medio.

Los niveles de detección del método alternativo Easy QFast® y del método de referencia son similares.

La exclusividad e inclusividad son totalmente satisfactorios para ambos medios empleados en el método alternativo tanto para Easy QFast® como Easy QFast® veterinaria

### **Las conclusiones del estudio colaborativo son:**

Los resultados obtenidos en el colaborativo de eficacia, especificidad y sensibilidad relativa son algo más altos que en el estudio comparativo, esto es así ya que los datos de la validación corresponden a un alcance muy amplio.

**En función de los resultados obtenidos en la presente validación se establece que ambos métodos son equivalentes.**

### **Las conclusiones de las auditorías realizadas han sido:**

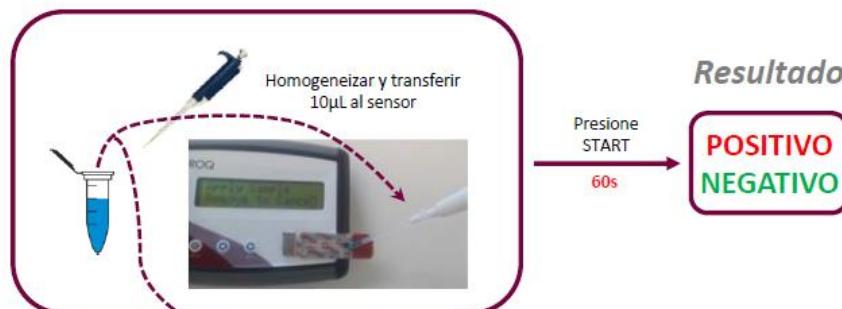
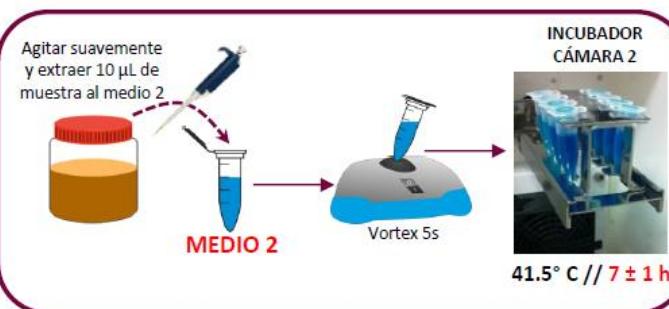
Tanto los resultados de las auditorías realizadas así como los ensayos de ejecución han sido satisfactorios en los años 2014, 2015 y 2016.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Agustina Sanchez".

Madrid, 08/05/2017  
Agustina Sanchez Díaz  
Directora Técnica

Anexo 1—Protocolo del método alternativo Easy QFast®

## Protocolo QFast Salmonella EASY



Confirmación positivo

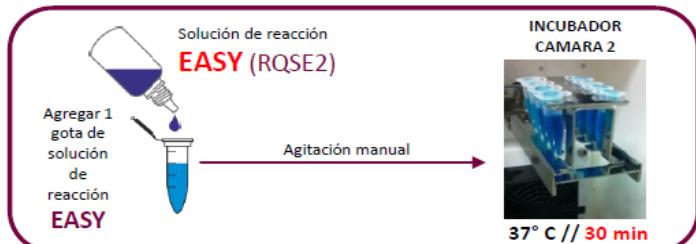
Puede ser realizada mediante cualquier método certificado

## Protocolo QFast Salmonella HARD EASY VETERINARY



‡ Opcional: una vez incubada, la muestra en el MEDIO 1 puede ser refrigerada (entre 2 y 8°C) hasta un máximo de 48 horas antes de continuar con el procedimiento.

† Opcional: puede realizar una transferencia intermedia en un recipiente estéril para facilitar la extracción de 100 µL de muestra.



**Resultado**

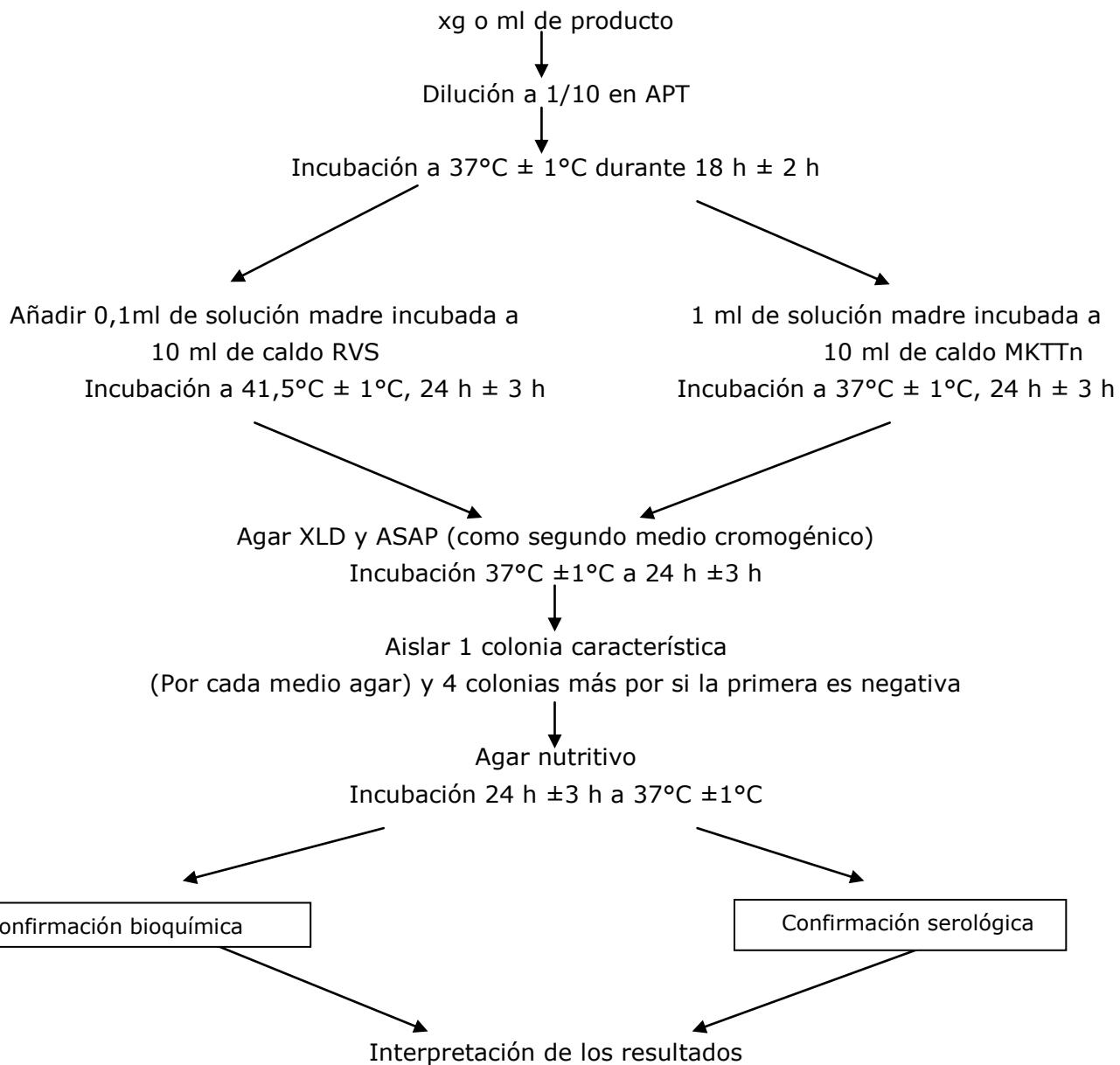
**POSITIVO**  
**NEGATIVO**

**Confirmación positivo**

Puede ser realizada mediante cualquier método certificado

**Anexo 2 – Método de referencia**

**UNE-EN ISO 6579:2003 Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.**



**Anexo 3 - Método de referencia**

**UNE-EN ISO 6579/A1 - Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.**

**Modificación 1: Anexo D: Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria**

