

Conclusiones sobre la validación de los protocolos Microkit optimizados para análisis microbiológico de aguas respecto a la normativa relacionada, mediante los ensayos intercomparativos Seilagua®

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

Introducción y objetivos

A la vista de los resultados analíticos de numerosos laboratorios de análisis de aguas que nos han confiado nuestras asesorías microbiológicas y han trabajado con el apoyo de nuestros servicios intercomparativos en los últimos años, y en aras a una mejora de la metodología tradicional, hemos realizado una optimización de los protocolos tradicionales para análisis microbiológico de aguas que se basan en las diversas Normas ISO indicadas en los Reales Decretos 1074/2002 sobre aguas envasadas y 140/2003 sobre aguas de consumo humano, así como en la ISO 11731 para *Legionella pneumophila*.

Dicha optimización, basada en los mejores resultados obtenidos por los laboratorios que aplican las diversas mejoras que allí se contemplan, está resumida en las 48 páginas del "Protocolo GLOBAL validado para la ejecución correcta de análisis de aguas (e intercomparativos Seilagua®)". Sin embargo, el desarrollo completo del tema se puede estudiar mucho más profundamente en los diversos protocolos de título similar que hemos desarrollado, uno para cada parámetro microbiológico concreto y otro para ambientes y operarios en plantas de embotellado y potabilizadoras (de 17-69 páginas cada uno y que están indicados en el capítulo de bibliografía).

La presente publicación pretende terminar, al fin, con este vacío en la optimización de los métodos microbiológicos de análisis de aguas, que tan necesaria consideramos. Estamos convencidos de que los laboratorios comprometidos con la calidad agradecerán nuestros esfuerzos y aplicarán estos protocolos con todo rigor, en

aras a la detección de los eventuales problemas microbiológicos que pudieren surgir en el futuro en sus aguas, evitando así las sanciones administrativas que algunos de ellos ya han sufrido.

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

Material y métodos

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

Para ello, hemos ido comparando los resultados de los laboratorios participantes en el servicio intercomparativo microbiológico de muestras de agua, Seilagua®, desde la creación de este en abril de 2002, con los resultados de nuestro laboratorio piloto de control de calidad (donde las personas que aparecen tras el autor principal, coordinador del servicio, utilizaban dichos protocolos al pie de la letra, desconociendo siempre cuál era el inóculo, elaborado en cada servicio y guardado en estricta confidencialidad por el autor principal).

*Laboratorios Microkit, S.L. Mayo de 2008.

Los métodos de contraste han sido el Real Decreto 1074-2002 sobre aguas envasadas (y Normas ISO derivadas), el R.D. 140-2003 sobre aguas de consumo humano (y Normas ISO derivadas), la Norma ISO 11731 para *Legionella pneumophila* y otras normas ISO/UNE, en que se basaban todos los laboratorios participantes que no utilizaban el protocolo Microkit y en el que se siguen basando todos los laboratorios de España que todavía no han implantado nuestros consejos y conclusiones, que por eso publicamos aquí.

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

De este modo, hemos trabajado comparativamente durante 6 años de servicios intercomparativos Seilagua®, con 24 servicios y un total de 584 muestras con 14 parámetros cada una, analizadas entre un total de 70 laboratorios participantes de toda España que, por obvios motivos de confidencialidad, no pueden ser revelados. Aunque los informes completos que demuestran todos los resultados y conclusiones solo han estado disponibles para estos 70 participantes de Seilagua®, ellos también leerán esta publicación, de modo que nadie puede pensar que los datos puedan estar manipulados a conveniencia de los productos Microkit.

Resultados

Los resultados de 24 informes Seilagua® ocuparían cerca de 1.000 páginas, por lo que nos limitamos a exponer aquí el resumen de resultados y alguna tabla de ejemplo extraída de diferentes informes Seilagua®. En esta publicación, preferimos abundar en las conclusiones.

Tabla 1. Ejemplo de calificaciones obtenidas por los laboratorios participantes en Seilagua® 12°, de enero de 2005. La calificación es el resultado de restar de 10, un punto por cada error analítico. Marcamos en rojo los 10 resultados pobres (< 6,5/10).

Clave del laboratorio	Calificación	Clave del laboratorio	Calificación
R621	7,2	1650	8,7
R988	10	2533	6,2
A747	5	2552	5,3
F03M	9,1	2850	7,1
F18M	9,1	3239	5,9
F37R	8,1	3333	8,7
F768	6,9	5495	6,2
F99A	7,2	6139	9,7
1111	9,7	7172	5,9
1550	7,8	8790	5,5
Media	7,46		
Desviación estándar	1,6		

Tabla 2. Evolución de la mejora de los resultados de los laboratorios participantes en Seilagua® 23°, de octubre de 2007. Obsérvese como los resultados pobres (< 6,5/10) bajan de 7 a 1.

Nº clave del laboratorio	Calificación	Nº clave del laboratorio	Calificación
D265	8	1043	7
D879	0	1218	7,8
D911	10	2222	10*
F03M	8,9	4386	9
F606	10	460-	8
F74A	8,75	5007	7,6
F768	8,4	5338	7,3
R25A	10	5387	8,2
HM55	8		
Media	8		
Desviación estándar	2,2		

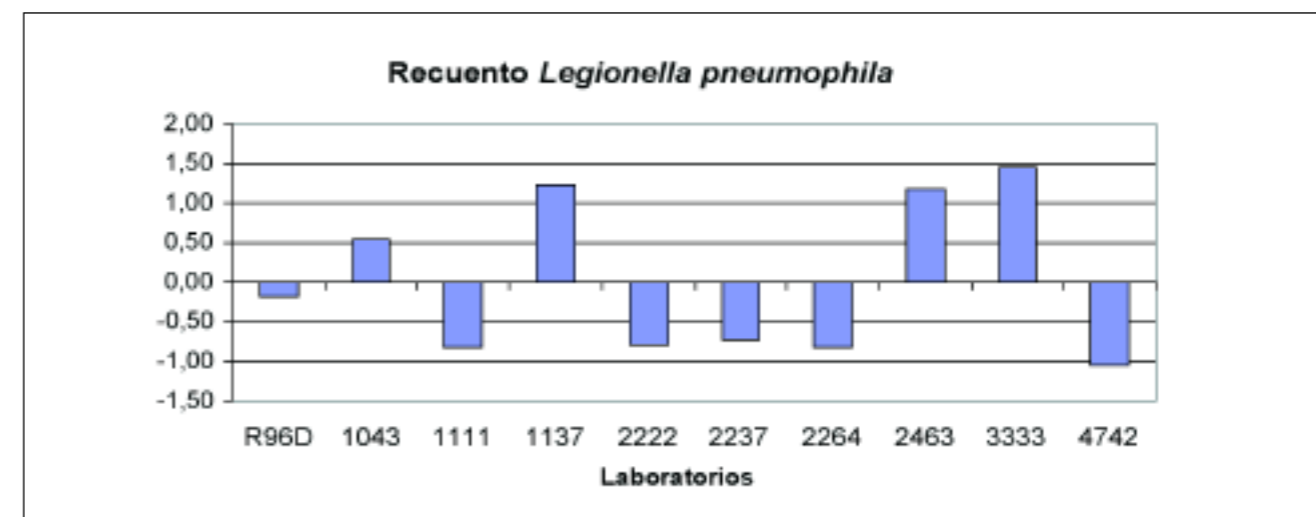
* El laboratorio 2222 nos ha autorizado a publicar que utiliza los protocolos Microkit; obtiene en todos los ejercicios Seilagua® la máxima puntuación, al no cometer ni un solo fallo analítico con respecto al inóculo completo.

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

En la exactitud y la precisión de los parámetros cuantitativos (Recuento de microorganismos cultivables a 22 °C, Recuento de microorganismos cultivables a 35-37 °C y Recuentos de *Pseudomonas aeruginosa*, *B. cepacia*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, *Cianobacterias*, *E. coli*, *Coliformes totales*, Enterococos fecales, *Clostridium perfringens* y/o sus esporas), no ha habido diferencias significativas entre los diferentes métodos, ya que no se detectan, mediante la herramienta de las z-scores, datos aberrantes en ninguno de los métodos ni medios, excepto en ciertos casos de *Legionella pneumophila* analizada por método ISO 11731 y de *Clostridium perfringens* analizado con el medio m-CP (R.D. 1074-2002 y R.D. 140-2003).

Sin embargo, en cuanto a la detección cualitativa de microorganismos, la sensibilidad, especificidad y eficacia demostradas para el protocolo Microkit en todos los parámetros comparados (detección de *Pseudomonas aeruginosa*, *B. cepacia*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Cianobacterias*, *E. coli*, *Coliformes totales*, Enterococos fecales, *Clostridium perfringens* y/o sus esporas) ha sido de un impresionante 100% en todos los parámetros, ya que no ha habido ni un solo falso positivo ni un solo falso negativo utilizando estrictamente el protocolo Microkit comparado con las cepas inoculadas y con las cepas no inoculadas en todas las muestras. Por el contrario, los métodos que se consideran de re-

Tabla 3. Ejemplo de resultados cuantitativos intercomparados con z-scores (todos correctos al estar dentro de ±2) en un parámetro que resulta mucho más conflictivo para los laboratorios que no presentan recuentos, que a menudo reportan falso negativo.



ferencia, han supuesto, como media, una eficacia del 80%, lo que corresponde a un total de falsos positivos + falsos negativos del 20% (1 fallo de cada 5 análisis realizado con dichos métodos), algo preocupante en la España del siglo XXI. Concretando en los parámetros más críticos, los peor parados son los análisis de *Clostridium perfringens* y sus esporas, con una eficiencia de solo el 29%, correspondiente a una proporción de resultados falsos positivos y sobre todo falsos negativos del 71%, sin duda por la aplicación a ojos cerrados y sin validar, que numerosos laboratorios hacen del medio m-CP recomendado en el R.D. 140-2003 y que demuestra así su clara invalidez. Los análisis de *Legionella pneumophila* por el método ISO 1174 son los que siguen por detrás, con un 54% de eficacia. Los de *Vibrio cholerae* por MF, con un 60% de eficiencia (que corresponde a un 40% de fallos –sobre todo falsos negativos–, 2 de cada 5 resultados dados). Les sigue de cerca *Staphylococcus aureus*, que falla en el 38% de las muestras (la mayoría por uso de Baird Parker, un medio estupendo en alimentos y que se demuestra así nefasto en aguas). Otro parámetro conflictivo es *Pseudomonas aeruginosa*, que solo se detecta bien en el 79% de las muestras (21% de resultados incorrectos, más de 1 de cada 5 análisis). En cambio el parámetro mejor parado en todos los métodos es Enterococos fecales, que prácticamente consigue una eficacia de más del 99% con solo algún fallo esporádico de detección. Todo ello demuestra que esos métodos oficiales funcionan peor que los métodos propuestos en los protocolos Microkit o, al menos, que están mal implantados en los laboratorios participantes.

Tabla 5. Ejemplo de la eficiencia de los diferentes medios de cultivo utilizados en la detección de E. coli. Se demuestra que muchos laboratorios no confirman las colonias aisladas, aplicando la mala práctica de confiar en su aspecto para emitir sus informes.

Medio de cultivo	% lab. usan	% falsos positivos
MUGPLUS agar	41	8
Tergitol-Chapman TTC Agar	33	75
Compact-Dry-Plates® EC	26	0

Por todo ello validamos el protocolo Microkit como el más eficaz (100% eficiente) y sometemos a la consideración de cada laboratorio el mantenimiento del uso estricto de los protocolos que, hasta ahora, se han considerado de referencia (los derivados de los RR.DD. mencionados), o bien la implantación de los mismos con las mejoras propuestas por Microkit en sus protocolos y, al menos, en el presente artículo.

Los laboratorios que han ido levantando acciones correctivas a raíz de los resultados de sus participaciones en Seilagua® han encontrado en esta herramienta de intracomparación la forma más fácil y económica de validar la implementación de sus me-

Tabla 4. Ejemplo de resultados cualitativos de Legionella pneumophila ausencia (presencia del interferente Legionella micdadei: 5,3 x 103 ufc/l). Se demuestra que la mayoría de participantes no han confirmado las colonias.

D879	F03M	F331	1292	1367	5395	7172
Sí	No	No	No	Sí	Sí	Sí

jas. Todos ellos han ido mejorando unos resultados que empezaron siendo, desde deficientes hasta muy deficientes (véase Tabla 1), y ahora son entre notables y excelentes (véase Tabla 2).

Conclusiones

De cerca de 1.000 páginas de los informes Seilagua® realizados en los últimos seis años, puestas en común de lo que están haciendo los laboratorios españoles de análisis de aguas (potabilizadoras, envasadoras, laboratorios públicos y privados de análisis a terceros), se extraen numerosas conclusiones de la máxima trascendencia:

1. La proporción de resultados incorrectos (falsos positivos + falsos negativos) utilizando los métodos oficiales es muy elevada, de cerca de un 20%, lo que corresponde a un fallo analítico cualitativo de cada 5 investigaciones. Esto no significa necesariamente que dichos métodos sean malos, quizá lo sea la implantación no validada que hacen muchos laboratorios a ojos cerrados. Tampoco tiene por qué corresponderse con la realidad del día a día analítico, ya que los servicios intercomparativos suelen incluir "trampas" que no se dan en la naturaleza para mostrar a los laboratorios participantes cuáles son sus puntos más críticos. Pero sí alerta y refleja la situación general de los participantes ante muestras complejas.

Estos resultados corresponden al método de filtración de membrana, que es el utilizado por la gran mayoría de participantes, ya que se confirman de nuevo los datos de las publicaciones previas sobre validación del método Presencia/Ausencia y de los kits P/A de MICROKIT (ver bibliografía) en las que se demuestra que el método P/A detecta con una abrumadora eficiencia en todos los parámetros.

2. Los parámetros más conflictivos en aguas son, por orden decreciente de eficiencia (entendiendo la eficiencia como la escasez global de falsos positivos y de falsos negativos):

Parámetro	Eficiencia
1° <i>Clostridium perfringens</i> y sus esporas	.29%
2° <i>Legionella pneumophila</i>	.54%
3° <i>Staphylococcus aureus</i>	.62%
4° <i>Vibrio cholerae</i>	.60%
5° <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	.79%
6° <i>E. coli</i>	.78%
7° Coliformes	.80%

En cambio, los Enterococos fecales resultan el mejor parámetro analítico, al obtener una eficiencia superior al 99%.

3. La falta de investigación rutinaria de ciertos parámetros en ciertos tipos de agua, es sumamente peligrosa: *Pseudomonas aeruginosa* (en aguas de consumo indica retrocontaminación desde grifos), *B. cepacia* (emergente en aguas de consumo y en-

vasadas, al ser ubicua del biofilm), Enterococos fecales a la salida de las potabilizadoras (no obligados pero sí extremadamente recomendables, al demostrarse tan poco fiables los parámetros coliformes/*E. coli*), *Vibrio cholerae* (emergente a causa de la inmigración subsahariana), *Staphylococcus aureus* (contaminante por bañistas portadores en aguas de baño), *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* (aunque Coliformes-*E. coli* y Enterococos fecales sean indicadores suyos, no es redundante saber detectarlos también), recuento de cianobacterias potencialmente cianotoxigénicas (ya que las microcistinas no son las únicas toxinas sumamente letales producidas por las más frecuentes cepas de cianobacterias presentes en España)... Aunque no sean explícitamente buscados por las autoridades españolas, existe una Ley General de Sanidad que exige la ausencia de patógenos en aguas de consumo, bebida y baño, además de que es evidente la necesidad de su control en pro de la salud humana. Gracias a Seilagua®, ya existe, a fecha de envío de este artículo, una proporción de laboratorios españoles buscando activamente estos patógenos emergentes. El caso nos recuerda el tema de *Legionella pneumophila* hace solo unos pocos años, en el que hasta que no hubo reiteradas muertes de población humana, y la consecuente legislación al respecto, no se implantó masivamente su búsqueda. Confiamos en que tras esta publicación, el porcentaje de laboratorios que saben detectar todos estos parámetros, aunque solo sea en su participación en Seilagua®, suba al 100%, sin necesidad de esperar a que la legislación prospere al ritmo de los actuales tiempos de globalización.

4. Uno de los parámetros conflictivos utilizando el método oficial (22% de ineficacia) es nada menos que *E. coli*, el microorganismo más buscado del mundo, lo cual es sumamente grave. Como en aguas es un indicador de contaminación fecal que solo suele resistir un día (y mucho menos en aguas marinas), a menudo resulta imposible encontrarlo, sobre todo si la muestra es llevada por el cliente al laboratorio en las condiciones indeseables en que suelen llegar, cosa que tristemente no contemplan ni siquiera las más modernas tendencias normativas; por eso es tan importante incluir también en la rutina diaria el parámetro más general que también puede indicar contaminación por aguas fecales: **coliformes totales**, y si el medio utilizado detecta los dos de forma diferencial (como el MUGPLUS de Microkit), tanto mejor. Sin embargo, y dado que los coliformes tampoco resultan un parámetro muy eficiente en aguas, apuntamos la extrema conveniencia de añadir también a la rutina analítica el parámetro de los **Enterococos fecales**, que tan excelentes resultados (cualitativos y cuantitativos) proporciona prácticamente siempre en prácticamente todos los laboratorios. Los tres (*E. coli*, Coliformes y Enterococos fecales) son parámetros indicadores de contaminación por aguas fecales, pero solo el último demuestra una eficiencia excelente en todos los laboratorios.

5. El parámetro más conflictivo es el de *Clostridium perfringens* y sus esporas, con un nivel de resultados falsamente negativos del 71%, algo tan inusual que obliga a plantearse si este parámetro vale la pena, o si debería cambiarse por el de "Clostridios sulfi-

to-reductores", que también engloban los *Cl. perfringens* y sin embargo son de más fácil detección. Los puntos más críticos no se limitan al medio de cultivo indicado por Norma: el m-CP Agar (cuya recuperación es habitualmente de un 10% con respecto a otros medios como el TSC), sino también al hecho de oxigenar un anaerobio estricto mediante el método de filtración, al de incubar la membrana sin doble capa, a una identificación muy poco efectiva y al uso de atmósferas anaerobias mal (o nada) controladas. La importancia del control rutinario de este parámetro radica en el hecho de que la presencia de esporas de Clostridios sulfito-reductores (incl. *Cl. perfringens*) son indicadores de una depuración deficiente, ya que los Enterovirus y las formas de resistencia de protozoos parásitos (Entamoeba, Cryptosporidium, Giardia...) se encuentran asociados a las mismas, en aguas naturales o con una escasa potabilización.

6. El límite de detección de muchos laboratorios es inadecuadamente alto, como se demuestra en los servicios Seilagua® en los que dichos laboratorios no detectan valores inoculados de incluso 70 ufc/100 ml de alguna de las cepas; el caso extremo es *Legionella pneumophila*, para la que muchos laboratorios no detectan ni siquiera cuando está presente a nivel de 10⁶ ufc/litro, y la mayoría no detectan cuando está por debajo de 800 ufc/litro. Por ello proponemos una revisión a fondo de ciertas normas que presentan problemas en su aplicación práctica, como es claramente la ISO 11731 de *Legionella pneumophila*. El uso de caldo GVPC (como el diseñado por Microkit) como revitalizador no multiplicador de las cepas estresadas, la filtración de no más de 200 ml de agua por membrana (uso de 5 membranas por litro) y el extremo cuidado en los tiempos de los shocks térmico y ácido resultan, entre otros puntos críticos, de la máxima relevancia.

7. Otro parámetro muy conflictivo es *Staphylococcus aureus*, donde debemos olvidarnos de que existe un medio llamado Baird Parker, que solo demuestra ser apto (y mucho) para alimentos, pero en aguas lo declaramos invalidado por sus continuos falsos negativos. Y utilizar el Agar Mannitol Hipersalino de Microkit, con siembra de la membrana en doble capa (para evitar falsos positivos de aerófilos no fermentadores), por haber quedado validado mediante Seilagua®.

8. También es un parámetro conflictivo *Pseudomonas aeruginosa*, en este caso no por los métodos oficiales ni por los medios de cultivo Cetrimida y Cetrimida CN, que se han demostrado muy adecuados en microbiología acuática (la Norma UNE 12780 nos parece de las mejores que hemos encontrado en todos los ámbitos microbiológicos), sino por incubar a 42 °C (como hacen muchos laboratorios por deformación de métodos clínicos, en los cuales la cepa es abundante y está muy activa), en lugar de los 35 °C que es la temperatura adecuada, ya que siempre es mejor obtener falsos positivos para confirmar, que falsos negativos.

9. Se observa que muchos laboratorios siembran indiscriminadamente **en masa o en superficie** según los medios de cultivo

comerciales que adquieren sean placas preparadas o tubos-frascos preparados, cuando el rigor en microbiología nos exige sembrar en masa cuando buscamos aerobios totales, microorganismos fermentativos (como coliformes-*E. coli* y *Staphylococcus aureus*) o anaerobios (como *Clostridium perfringens*); y sembrar en superficie cuando buscamos otros microorganismos (como Enterococos fecales, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella*, *Shigella*...) y sobre todo si son aerófilos extremos (como las Cianobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*).

10. Muy pocos laboratorios participantes demuestran utilizar de forma rutinaria **cepas** para controlar que su método, sus reactivos y sus analistas trabajan correctamente, con lo cual no detectan cuáles son los puntos críticos de sus análisis en los que poder aplicar indicadores de control. Muy pocos laboratorios participantes **identifican** las colonias aisladas, que hemos de recordar que siempre son presuntivas en cualquier medio de cultivo sólido, incluidos los modernos cromogénicos. Con ello pierden importantísima información de los escasos positivos que suelen obtener. Y todavía menos laboratorios **validan** sus métodos analíticos con sus muestras, analistas y reactivos, cuando Sanidad lo exige activamente y ya existen cursos y consultorías específicas sobre el tema, como las impartidas por Microkit.

11. La adición de reactivo TTC al medio de cultivo para recuento total de aerobios **resulta adecuada**, ya que la concentración a la que resulta inhibitorio es 10 veces superior a la que recomendamos aplicar en nuestros protocolos (que es de solo 1-2 ml de solución 1% en 1 l de medio final). La ventaja es la detección más cómoda para el ojo humano, al teñirse las colonias de rojo y distinguirse del medio, de las burbujas y de los restos de muestra, así como de las membranas cuando se enumeran aerobios por filtración en muestras mayores a 1 ml. Incluso se obtienen mejores resultados con TTC, porque las colonias diminutas no pasan desapercibidas como en los medios clásicos: La validación interna realizada en Laboratorios Microkit con casi 100 cepas y la validación que resulta de la participación de numerosos laboratorios en Seilagua® con este aditivo, así lo demuestran, al registrar con TTC recuentos siempre más elevados (aunque dentro de z-scores).

12. Muchos laboratorios recuentan sin realizar **triplicados de placas** o, si lo hacen, solo nos envían la media del recuento obtenido; esto les descalifica para la participación en servicios intercomparativos, ya que con sus resultados no pueden incluirse en métodos estadísticos mínimamente fiables; pero además están arriesgando mucho en su día a día, al ofrecer resultados poco contrastados y que dependen demasiado del azar.

13. Muchos laboratorios **expresan sus resultados** de manera inadecuada, ya que "incontables" o "> 1.000 ufc/ml" o "< 100 ufc/100 ml" no son expresiones aceptables para un resultado microbiológico preciso.

14. Se observa que la **siembra en masa por inclusión en agar**

caliente para el recuento de aerobios es un punto crítico más importante de lo que imaginábamos, ya que numerosos laboratorios (incluso con técnicos que gozan de décadas de experiencia en el análisis microbiológico) confían en su tacto y no esperan a que el medio esté suficientemente frío, impidiendo así muy a menudo el crecimiento de los microorganismos presentes. Estos falsos negativos se empieza a demostrar, también gracias a Seilagua®, que quedan totalmente descartados con métodos más modernos de siembra en masa sin calentamiento, como las Compact-Dry-Plates® -TC.

15. Resulta curioso que el método utilizado por uno de los 4 laboratorios que obtienen la máxima calificación en el 23º servicio de Seilagua® sea, en todos los parámetros, el de las **Compact-Dry-Plates®** adecuadas para cada uno de dichos parámetros. Si se reiteran estos resultados en los futuros Seilagua®, habremos de dar por validado dicho método no solo como han hecho AOAC y Microval para alimentos, sino también, por parte de Microkit, para aguas.

16. Muy pocos **laboratorios de alimentos y cosméticos** le dan al agua la importancia extrema que merece como materia prima fundamental en sus productos, ya que casi ningún laboratorio de ese tipo de industrias participa en Seilagua®, creyendo que el hecho de obtener un buen resultado del análisis del producto final (una vez contrastado con ensayos intercomparativos como Seilalimentos y Seilaparfum) les permite bajar la guardia en el punto crítico más importante de cuantos tienen: el agua de producción.

17. La mayoría de laboratorios de España se asustan ante la participación en un ejercicio intercomparativo como Seilagua® y **ni siquiera lo intentan**, cuando se les asegura la máxima confiabilidad y se les aconseja como la mejor herramienta de control de calidad de sus procesos analíticos. Esta participación es ya obligada por Sanidad (y de forma habitual) por parte de cualquier laboratorio que quiera ser autorizado por las autoridades competentes de nuestro país. Pero es que además es la única herramienta con la que cuentan para poder conocer objetivamente el grado de fiabilidad de sus resultados analíticos. Y para mantener sus métodos revalidados en continuo.

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

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

20. Como conclusión final, es evidente que los laboratorios que participan asiduamente en los servicios intercomparativos Seilagua® demuestran la utilidad de estos servicios también en su versión intracomparativa, al **aumentar sus calificaciones con respecto a sí mismos** a causa de las mejoras que van implantando a raíz de los puntos críticos detectados y de las recomendaciones obtenidas en los informes trimestrales.

Agradecimientos

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

Bibliografía

- R.D. 1074/2002 de 18 de octubre sobre aguas de bebida emvasadas. BOE 29.10.2002
- R.D. 140/2003 de 7 de febrero sobre calidad de aguas de consumo humano. BOE 21.02.2003
- R.D. 865/2003 de 4 de julio sobre prevención y control de la legionelosis. BOE 18.07.2003
- Norma ISO 6222. Calidad del agua. Enumeración de microorganismos cultivables. Recuento de colonias por siembra en medio de cultivo de agar nutritivo (YEA).
- Norma ISO 9308. Calidad del agua. Detección y recuento de *E. coli* y de bacterias Coliformes.
- Norma ISO 7899. Water quality-Detection and enumeration of intestinal enterococci.
- Norma UNE 12780. Calidad del agua. Detección y recuento de *Pseudomonas aeruginosa* por filtración de membrana.
- Norma ISO 11731. Calidad del agua: detección y recuento de *Legionella*
- Norma ISO/CD 26461. Calidad del agua. Detección y recuento de los esporos de microorganismos anaerobios sulfito-reductores (*Clostridia*).
- ISO/CD 6461-2:2002 Water quality-Detection and Enumeration of *Cl. perfringens*
- Validación del método P/A (presencia/ausencia) para la detección de patógenos e indicadores en aguas, mediante un estudio intercolaborativo y otro intercomparativo. Jorge Sanchis Solera, Laboratorios Microkit y otros 62 autores. *Técnicas de Laboratorio* 282, junio 2003.
- Validación microbiológica de los kits presencia/ausencia (P/A) microkit, frente a la filtración de membrana (MF), en los servicios intercomparativos seilagua®, mediante una novedosa hoja de cálculo. Jorge Sanchis Solera, María Morales, Sylvia Ajates, Laboratorios Microkit, s.l. *Técnicas de Laboratorio* 312, junio 2006.
- Informe Seilagua® 1, Laboratorios Microkit, abril 2002
- Informe Seilagua® 2, Laboratorios Microkit, julio 2002

- Informe Seilagua® 3, Laboratorios Microkit, octubre 2002
- Informe Seilagua® 4, Laboratorios Microkit, enero 2003
- Informe Seilagua® 5, Laboratorios Microkit, abril 2003
- Informe Seilagua® 6, Laboratorios Microkit, julio 2003
- Informe Seilagua® 7, Laboratorios Microkit, octubre 2003
- Informe Seilagua® 8, Laboratorios Microkit, enero 2004
- Informe Seilagua® 9, Laboratorios Microkit, abril 2004
- Informe Seilagua® 10, Laboratorios Microkit, julio 2004
- Informe Seilagua® 11, Laboratorios Microkit, octubre 2004
- Informe Seilagua® 12, Laboratorios Microkit, enero 2005
- Informe Seilagua® 13, Laboratorios Microkit, abril 2005
- Informe Seilagua® 14, Laboratorios Microkit, julio 2005
- Informe Seilagua® 15, Laboratorios Microkit, octubre 2005
- Informe Seilagua® 16, Laboratorios Microkit, enero 2006
- Informe Seilagua® 17, Laboratorios Microkit, abril 2006
- Informe Seilagua® 18, Laboratorios Microkit, julio 2006
- Informe Seilagua® 19, Laboratorios Microkit, octubre 2006
- Informe Seilagua® 20, Laboratorios Microkit, enero 2007
- Informe Seilagua® 21, Laboratorios Microkit, abril 2007
- Informe Seilagua® 22, Laboratorios Microkit, julio 2007
- Informe Seilagua® 23, Laboratorios Microkit, octubre 2007
- Informe Seilagua® 24, Laboratorios Microkit, enero 2008
- PRT-SEILA-002, Protocolo global validado para la ejecución correcta de análisis de aguas (e intercomparativos Seilagua®) (39 páginas)
- PRT-AL/AG-020, Análisis microbiológico del ambiente y opera-

- rios en industria agroalimentaria y en potabilizadoras de agua (61 páginas)
- PNT-AG-001, Aguas: recuento de anaerobios (15 páginas)
- PNT-AG-002, Aguas: recuento de anaerobios sulfito-reductores (17 páginas)
- PNT-AG-003, Aguas: determinación y recuento de sulfato-reductores (16 páginas)
- PNT-AG-005, Aguas: detección y recuento de *Enterococos fecales* (46 páginas)
- PNT-AG-006, Aguas: detección y recuento de Coliformes y *E. coli* (48 páginas)
- PNT-AG-007, Aguas: detección y recuento de *Legionella pneumophila* (52 páginas)
- PNT-AG-008, Aguas: detección y recuento de *Pseudomonas aeruginosa* (54 páginas)
- PRT-COSM/AG-009, Investigación de *Burkholderia cepacia* en cosméticos y aguas (33 páginas)
- PNT-AG-011, Aguas: Detección y recuento de *Clostridium perfringens* y sus esporas (46 págs)
- PNT-AG-012, Aguas: Recuento de cianobacterias toxigénicas a niveles peligrosos (52 páginas)
- PRT-VAL-001 Protocolo para validación en microbiología (69 páginas).
- PRT-VAL-1+2, Ídem, incluido CD con hojas de cálculo en Excel.

(Véase anuncio en la sección **Guía del Comprador**.)