

CERTIFICADO DE VALIDACIÓN DE ANÁLISIS DE AGUAS



Certificamos que el método y/o productos:

Protocolo SEILAGUA® para análisis microbiológicos de aguas (presentaciones y referencias MICROKIT® entre paréntesis) (PRT-SEILA-002, de 39 páginas, así como los específicos para cada parámetro derivados de aquél PRT-AG-001 a PRT-AG-012), llevado a cabo mediante los medios de cultivo en él indicados, en concreto los métodos y medios/kits para: **Cetrimide Agar** (DMT034, TPL100, RPL010, PPL906, y su versión **caldo cromogénico Pseudomonas P/A**: RPL302, FPA903), **YEA-NUTRIENT AGAR CROMOGÉNICO** (BCD511, TPL060, RPL106, PPL901), **COMPACT-DRY-PLATES®-TC** (1000166), **GVPC Broth** (TPL016), **GVPC Agar** (DMT007+SBL604, RPL018+SBL604, PPL908), **Mannitol Salt Agar** (DMT078, TPL066, RPL023, PPL907 y su versión caldo P/A: RPL320, FPA907), **COMPACT-DRY-PLATES®-STAF** (1002960), **SS Broth** (DMT067, TPL401, RPL060, idem concentrado en tubos P/A: RPL331), **CHROMOSALM Agar** (DMT500, TPL402, RPL012, PPL925), **XLD Agar** (DMT142, TPL504Z), **MugPlus Cfs.Vanc.Agar** (DMT400, TPL400, RPL444, PPL902, incl. **COMPACT-DRY-PLATES®-EC** 1000168), **MCC Broth** (DMT900, TPL637 y su versión P/A COLICULT: RPL303, FPA900) (Ver aparte certificado de validación de **Coliformes y E.coli**), **Slanetz-Bartley Agar** (DMT115, DMT117+SDA018, PPL909), **Bilis Esculina Azida Agar** (DMT160, TPL002, PPL915 y su versión caldo cromogénico P/A **ENTEROCULT**: RPL301, FPA901), **CAA AGAR** (DMT060, TPL190, RPL069), **COMPACT-DRY-PLATES®-ETC** (1002944), **SPS Agar** (BCD901, TPL089, TPL049, RPL039, RPL062), **TSC Agar** (DMT175, TPL137, PPL905 y su versión P/A **CLOSTRICULT**: RPL308, FPA902).

Cumplen con los estándares de VALIDACIÓN de la Norma UNE-EN-ISO 16140:2003, cuyos resultados se anexan. La validación está realizada mediante comparación utilizando cepas cuantitativas certificadas y trazables, frente a los métodos oficiales de referencia (Reales Decretos 1074/2002 y 140/2003, que redirigen a las respectivas Normas Técnicas vigentes ISO/UNE para microbiología de aguas, así como en la ISO 11731 sobre Legionella).

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

Este certificado permite al usuario del método y de los medios y kits validados, respaldarse en los estudios de validación/equivalencia de MICROKIT® para la validación interna o para la verificación interna de su método, medios y kits con sus propias matrices, equipos, analistas y en sus instalaciones, siempre que se empleen correctamente los métodos y productos referenciados y amparados en este certificado, que no pueden extrapolarse a otras marcas comerciales

Garantizado por:

A fecha: 09-Julio-2009

Jorge Sanchis Solera

Coordinador SEILAGUA® y Director de Calidad MICROKIT®

❖ METODO DE VALIDACIÓN

Se compara un mínimo de 20 muestras para cada uno de los parámetros microbiológicos implicados, la detección presencia/ausencia y el recuento obtenido siguiendo el [método MICROKIT®](#) (protocolo PRT-SEILA-002 y PRT-AG-001 a PRT-AG-012 de aguas) con [cepas cuantitativas certificadas HPA](#), con respecto al método oficial (Reales Decretos 1074/2002 y 140/2003, que redirigen a las respectivas Normas Técnicas vigentes ISO/UNE para microbiología de aguas, así como en la ISO 11731 de Legionella). Para ello se utilizan los [medios de cultivo MICROKIT®](#) descritos en dichos protocolos e indicados aquí.

Hacemos notar que el método MICROKIT para Coliformes y *E.coli* ya ha sido validado con resultados de excelencia y ha demostrado su equivalencia en nuestra anterior validación, publicada en 2008 en el Congreso de Microbiología de Córdoba y en Mayo de 2009 en la revista Técnicas de Laboratorio. Por eso sólo se vuelve a contemplar aquí en una de sus presentaciones (Compact-Dry-Plates®-EC), ya que este parámetro, por su trascendencia, tiene ese certificado de validación aparte. De igual forma los Kits P/A de MICROKIT® han sido reiteradamente validados en la última década, también con resultados de excelencia (consultar bibliografía al final de este certificado).

Los datos de la validación de Salmonella parten de otro ejercicio, en este caso de intercolaboración, en el que participaron 6 laboratorios, con 250 muestras comparadas, publicado en el XIX Congreso de Microbiología de Santiago de Compostela y en Mayo de 2003 en La revista Técnicas de Laboratorio. Por eso se incluye en este certificado.

Para las Compact-Dry-Plates®-STAF, el SS Broth para Shigella, y las Compact-Dry-Plates®-ETC los datos son prematuros. Sin embargo los datos actuales apuntan hacia la excelencia con respecto al método oficial en los tres casos, motivo por el cual las incluimos, aunque más adelante aportaremos los datos definitivos.

Por otra parte, se aprovecha para comparar todos los datos con los resultados obtenidos en matrices idénticas con inóculos idénticos, por los 70 laboratorios españoles participantes en el servicio intercomparativo SEILAGUA® de los últimos 7 años, con especial énfasis en los últimos, de 2007-2009, con un total de 28 tandas que suponen la comparación de más de **700 muestras** idénticas entre los participantes que utilizan el [MÉTODO DE REFERENCIA](#) y el [método MICROKIT®](#), lo cual sirve además como [re-validación periódica](#) de éste. Dada la homogeneidad de resultados, resumidos en la publicación intercomparativa "12/2007: **Protocolos MICROKIT** para control microbiológico de aguas, VALIDADOS mediante 6 años de ensayos intercomparativos SEILAGUA®. Técnicas de Laboratorio 332, 6/2008. VII Reunión Microbiología acuática SEM. Bilbao 9/2008", en la validación no se tienen en cuenta los datos de todas las muestras, sino las de los tres últimos años (12 circuitos intercomparativos entre 2007 y 2009), ya que hacerlo sólo multiplicaría un trabajo estadístico que resultaría redundante. Además en estos estudios de los 3 últimos años se utilizaban cepas cuantitativas certificadas, de modo que obtuvimos dos métodos simultáneos de contraste: cepas patrón y método de pares por intercomparación. De entre los 70 laboratorios participantes, al menos 6 están acreditados para análisis microbiológicos por la Norma ISO 17025, conforme solicita la ISO 17994 de equivalencia de métodos microbiológicos.

Las [MATRICES](#) empleadas fueron aguas de consumo, aguas envasadas, aguas brutas continentales, aguas purificadas farmacéuticas y aguas de refrigeración de aires acondicionados.

[Restricciones de uso](#) del protocolo y los medios y kits de MICROKIT®: El alcance de la validación no incluye aguas marinas o salobres, ni aguas de piscinas, no porque estén invalidados en ellas, sino simplemente porque todavía no se han comprobado suficientemente en las mismas, lo cual se podrá también realizar en una validación posterior.

❖ RESULTADOS

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

1. RESULTADOS DE PARAMETROS CUALITATIVOS

 PARÁMETRO	SENSIBILIDAD (escasez de Falsos Negativos)		ESPECIFICIDAD (escasez de Falsos Positivos)	
	% MÉTODO MICROKIT	% MÉTODO DE REFERENCIA	% MÉTODO MICROKIT	% MÉTODO DE REFERENCIA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P/A: 0 falsos negativos de 21 muestras 100 % SENSIBILIDAD >>>	UNE-EN-ISO 12780 Agar Cetrimide: 17 falsos negativos de 64 muestras 73,4 % SENSIBILIDAD	P/A: 0 falsos positivos de 12 muestras 100 % ESPECIFICIDAD >>>	UNE-EN-ISO 12780 Agar Cetrimide: 2 falsos positivos de 23 muestras 91,3 % ESPECIFICIDAD
<i>Legionella pneumophila</i>	Caldo GVPC+Agar GVPC 2 falsos negativos de 12 muestras (1) 83,3 % SENSIBILIDAD	ISO 11731 Agar GVPC 18 falsos negativos de 29 muestras 38 % SENSIBILIDAD (1)	Caldo GVPC+Agar GVPC 3 falsos positivos de 9 muestras 66,7 % ESPECIFICIDAD (2)	ISO 11731 Agar GVPC 7 falsos positivos de 35 muestras 80 % ESPECIFICIDAD (2)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Compact-Dry-Plates® STAF 0 falsos negativos de 9 muestras 100 % SENSIBILIDAD (3) ----- P/A: 0 falsos negativos de 12 muestras 100 % SENSIBILIDAD	Mannitol Salt Agar 6 falsos negativos de 15 muestras 60 % SENSIBILIDAD ----- Agar Baid Parker y RPF 5 falsos negativos de 17 muestras 71 % SENSIBILIDAD	Compact-Dry-Plates® STAF 0 falsos positivos de 6 muestras 100 % ESPECIFICIDAD (3) ----- P/A: 1 falsos positivos de 24 muestras 96 % ESPECIFICIDAD	Mannitol Salt Agar 3 falsos positivos de 18 muestras 83 % ESPECIFICIDAD ----- Agar Baid Parker y RPF 7 falsos positivos de 20 muestras 65 % ESPECIFICIDAD
<i>Salmonella spp.</i>	Agar Cromosalm MICROKIT®: 89,47 % SENSIBILIDAD (1)	ISO 6340, ISO 6579 47,22 % BGA, 62,96 % XLD SENSIBILIDAD (1)	Agar Cromosalm MICROKIT®: 98,45 % ESPECIFICIDAD	ISO 6340, ISO 6579 60,84 % BGA, 65,38 % XLD, 73,91 % Hektoen, 42,55 % SS Agar, 73,47 % Magenta-Gal ESPECIFICIDAD
<i>Shigella spp.</i>	Caldo SS MICROKIT®: 0 falsos negativos de 3 muestras 100 % SENSIBILIDAD (3)	Métodos típicos Salmonella: 2 falsos negativos de 3 muestras 33 % SENSIBILIDAD	Caldo SS MICROKIT®: 0 falsos positivos de 31 muestras 100 % ESPECIFICIDAD	Métodos típicos Salmonella: 6 falsos positivos de 28 muestras 79 % ESPECIFICIDAD
Coliformes- <i>E.coli</i>	Compact-Dry-Plates® EC 0 falsos negativos de 21 muestras (Colif. y <i>E.coli</i>) 100 % SENSIBILIDAD (4)	ISO 9308 Agar Tergitol TTC: 2 falsos negativos de 87 (Colif.) y 4 de 92 (<i>E.coli</i>) 97,7 y 95,6 % SENSIBILIDAD	Compact-Dry-Plates® EC 0 falsos positivos de 12 muestras (Colif. y <i>E.coli</i>) 100 % ESPECIFICIDAD (4)	ISO 9308 Agar Tergitol TTC: 2 falsos positivos de 87 (colif.) y 4 de 92 (<i>E.coli</i>) 94,2 y 94,6 % ESPECIFICIDAD
Enterococos fecales	Compact-Dry-Plates® ETC 0 falsos negativos de 10 muestras 100 % SENSIBILIDAD (3) ----- P/A ENTEROCULT: 0 falsos negativos de 24 muestras 100 % SENSIBILIDAD	ISO 7988 Slanetz-Bartley y Bilis Esculina 4 falsos negativos de 91 muestras 95,6 % SENSIBILIDAD	Compact-Dry-Plates® ETC 0 falsos positivos de 1 muestras 100 % ESPECIFICIDAD (3) ----- P/A ENTEROCULT : 0 falsos positivos de 10 muestras 100 % ESPECIFICIDAD	ISO 7988 Slanetz-Bartley y Bilis Esculina 16 falsos positivos de 41 muestras 61 % ESPECIFICIDAD
<i>Clostridium perfringens</i> y sus esporas	P/A CLOSTRICULT: 5 falsos negativos de 22 muestras (1) 77,3 % SENSIBILIDAD	R.D.1074/2002 y 140/2003 (m-CP Agar): 18 falsos negativos de 21 muestras 14,33 % SENSIBILIDAD (1) ----- ISO/CD 6461 (TSC Agar) 22 falsos negativos de 50 muestras 56 % SENSIBILIDAD (1)	P/A CLOSTRICULT: 0 falsos positivos de 12 muestras 100 % ESPECIFICIDAD	R.D.1074/2002 y 140/2003 (m- CP Agar): 0 falsos positivos de 11 muestras 100 % ESPECIFICIDAD ----- ISO/CD 6461 (TSC Agar) 1 falsos positivos de 24 muestras 95,8 % ESPECIFICIDAD

(1). Unas sensibilidades menores al 95%, pero mayores a las de los métodos de referencia, demuestran la idoneidad del uso del método MICROKIT para *Legionella* y para *Clostridium perfringens*, al ser dos parámetros muy conflictivos. El Clostricult P/A funciona mejor desde su modificación interna en 2008, rozando actualmente su sensibilidad el 100% en ambas presentaciones (frascos tomamuestras con medio líquido y viales prepesados con polvo estéril)

(2). La especificidad es del método completo, por lo que no se puede achacar el menor resultado MICROKIT que el del método de referencia, a la innovación que supone incorporar el Caldo GVPC revitalizante antes del método de referencia, sino a la mala interpretación de los posteriores látex (o incluso a la falta de su uso) por parte de muchos laboratorios.

(3). Deben tomarse con precaución la Sensibilidad y la Especificidad demostradas por las Compact-Dry-Plates®-STAF y por las Compact-Dry-Plates®-ETC, así como la Sensibilidad del SS Broth para Shigella, al no haber todavía suficientes datos comparativos.

(4). Al estar las Compact-Dry-Plates®-EC fabricadas con medio MUGPLUS, ya quedaban validadas en la anterior validación sobre Coliformes y *E.coli*, pero incluimos aquí los nuevos datos específicos de este formato.

Datos del estudio previo de 2002 a 2006 ya publicados en bibliografía:

 PARÁMETRO	DATOS 2002 A 2006 EFICIENCIA: SENSIBILIDAD + ESPECIFICIDAD (escasez de Falsos Negativos y de Falsos positivos)	
	% MÉTODO MICROKIT	% MÉTODO DE REFERENCIA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P/A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Broth: 95 % EFICIENCIA	UNE-EN-ISO 12780 Agar Cetrimide: 79 % EFICIENCIA
<i>Legionella pneumophila</i>	Caldo GVPC+Agar GVPC: 70 % EFICIENCIA	ISO 11731 Agar GVPC: 54 % EFICIENCIA
<i>Staphylococcus aureus</i>	P/A <i>Staphylococcus aureus</i> : 70 % EFICIENCIA	Agar Baid Parker y RPF: 62 % EFICIENCIA
<i>Salmonella spp.</i>	Agar Cromosalm MICROKIT®: 100 % EFICIENCIA	ISO 6340, ISO 6579 47,22 % BGA, 62,96 % XLD EFICIENCIA
<i>Shigella spp.</i>	Caldo SS MICROKIT®: 100 % EFICIENCIA	Métodos típicos Salmonella: 33 % EFICIENCIA
Coliformes- <i>E.coli</i>	P/A MCC COLICULT: Coliformes 86,5 % y <i>E.coli</i> 90% EFICIENCIA	ISO 9308 Agar Tergitol TTC: Coliformes: 80% y <i>E.coli</i> 78 % EFICIENCIA
Enterococos fecales	P/A ENTEROCULT: 100 % EFICIENCIA	ISO 7988 Slanetz-Bartley y Bilis Esculina: 95,6 % EFICIENCIA
<i>Clostridium perfringens</i> y sus esporas	P/A CLOSTRICULT: 70 % EFICIENCIA	R.D.1074/2002 y 140/2003 (m-CP Agar): 29 % EFICIENCIA

Puede observarse que el histórico de años anteriores de intercomparación SEILAGUA® 2002-2006 induce a las mismas conclusiones que la actual validación con cepas cuantitativas e intercomparación SEILAGUA® 2007-2009: En todos los casos el método MICROKIT® es más eficiente que el método tradicional, sobre todo por su muy superior Sensibilidad en todos los parámetros.

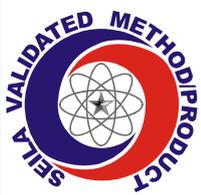
También los límites de detección resultan extraordinariamente optimizados mediante los protocolos MICROKIT, ya que si bien es cierto que en principio no tendría por qué ser así, los datos demuestran innumerables casos de detección con nuestros métodos cuando el inóculo es bajo, que el método de referencia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

LIMITE DE DETECCIÓN CONFIRMADO DESDE *:		
	MÉTODO MICROKIT	MÉTODO DE REFERENCIA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 ± 1 ufc/100 ml	150-192 ufc/100 ml
<i>Legionella pneumophila</i>	40 ± 10 ufc/litro	1000-10.000 ufc/litro
<i>Staphylococcus aureus</i>	70 ± 5 ufc/100 ml	100-1000 ufc/100 ml
<i>Shigella spp.</i>	sin confirmar	
Coliformes- <i>E.coli</i>	5 ± 2 ufc/100 ml (coincide en ambos parámetros al ser <i>E.coli</i> un coliforme y también coincide en ambos métodos)	
Enterococos fecales	41 ± 4 ufc/100 ml (coincide en los tres métodos)	
<i>Clostridium perfringens</i> y sus esporas	150 ± 10 ufc/100 ml	400-1500 ufc/100 ml

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

2. RESULTADOS DE PARAMETROS CUANTITATIVOS

Aunque el único parámetro cuantitativo de máxima importancia en aguas es el de aerobios totales (ya que en los demás indicadores y patógenos lo importante es que no haya ni una sola ufc), incluimos también los datos cuantitativos de todos los demás parámetros (excepto *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*), para satisfacer a las entidades más estadísticamente ortodoxas:

 PARÁMETRO	EXACTITUD (medida en recuperación relativa: cercanía de los recuentos al valor patrón - valor inóculo de referencia o valor aceptado en el intercomparativo-)		PRECISIÓN (dispersión de resultados medida en repetitividad y reproducibilidad, capacidad de presentar resultados equivalentes) Aunque depende más de otros factores que del medio/método, lo incluimos por purismo	
	% MÉTODO MICROKIT	% MÉTODO DE REFERENCIA	% MÉTODO MICROKIT	% MÉTODO DE REFERENCIA
Aerobios totales 22 °C	Compact-Dry-Plates® TC: 114 % **** ----- YEA-Cromogénico: 83%	ISO 6222 Agar YEA: 102 % ****	Compact-Dry-Plates® TC: < ± 0,1 log y 0 fuera de rango: OK ----- YEA-Cromogénico: < ± 0,16 log y 3% fuera de rango: OK	ISO 6222 Agar YEA: < ± 0,3 log y 22% de muestras fuera de rango: OK
Aerobios totales 35-37 °C	Compact-Dry-Plates® TC: 106 % **** ----- YEA-Cromogénico: 84 %	ISO 6222 Agar YEA: 108 % ****	Compact-Dry-Plates® TC: < ± 0,1 log y 0 fuera de rango: OK ----- YEA-Cromogénico: < ± 0,1 log y 3% fuera de rango: OK	ISO 6222 Agar YEA: < ± 0,4 log y 19% fuera de rango: OK
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	En recuento es el mismo método UNE-EN-ISO 12780 Agar Cetrimide: 80% *		En recuento es el mismo método UNE-EN-ISO 12780 Agar Cetrimide: < ± 1,57 log y 8% de muestras fuera de rango: OK	
<i>Legionella pneumophila</i>	ISO 11731 Agar GVPC tras revitalización caldo GVPC: 63,5 % *	ISO 11731 Agar GVPC 87,6% *	ISO 11731 Agar GVPC tras revitalización caldo GVPC No hay datos suficientes	ISO 11731 Agar GVPC < ± 0,45 log y 43% de muestras fuera de rango: POBRE
<i>Staphylococcus aureus</i>	Compact-Dry-Plates® STAF: 80% * ----- Mannitol Salt Agar: 42 % *	Baird Parker Agar y/o RPF: 29% **	Compact-Dry-Plates® STAF: < ± 0,1 log y 14% de muestras fuera de rango: OK ----- Mannitol Salt Agar: < ± 0,17 log y 17% de muestras fuera de rango: OK	Baird Parker Agar y/o RPF: < ± 0,57 log y 12 % de muestras fuera de rango: OK
Coliformes- <i>E.coli</i> (ver más resultados MUGPLUS en la validación/ equivalencia 2008)	Compact-Dry-Plates® EC: Coliformes: 171,4 % **** E.coli: 110,6% ****	ISO 9308 Agar Tergitol TTC: Coliformes: 119 % **** E.coli: 66,8 % *	Compact-Dry-Plates® EC: Colif) < ± 0,47 log, (y 7 % de muestras fuera de rango): OK (E.coli) < ± 0,33 (y 3 % de muestras fuera de rango): OK	ISO 9308 Agar Tergitol TTC: Colif) < ± 0,54 log, (y 15 % de muestras fuera de rango): OK (E.coli) < ± 0,39 (y 12 % de muestras fuera de rango): OK
Enterococos fecales	Compact-Dry-Plates® ETC: 55% *	ISO 7988 Slanetz-Bartley y Bilis Esculina: 74,4% *	Compact-Dry-Plates® ETC: No hay datos suficientes	ISO 7988 Slanetz-Bartley y Bilis Esculina: < ± 0,62 log y 3% de muestras fuera de rango OK
<i>Clostridium perfringens</i> y sus esporas	<i>Es preferible no enumerar y detectar la presencia o ausencia con un método validado como los viales de polvo Clostricult P/A, que obtener resultados tan poco fiables como los del método oficial</i>	ISO/CD 6461 (TSC Agar): 9,3 % ** ----- R.D.1074/2002 y 140/2003 (m-CP Agar): 1,9% ***	No puede haber datos de recuento en un método P/A	ISO/CD 6461 (TSC Agar): < ± 0,52 log y 43% de muestras fuera de rango POBRE ----- R.D.1074/2002 y 140/2003 (m-CP Agar): < ± 1,97 log y 100% de muestras fuera de rango MAL

* Totalmente dentro del valor estadístico standard de tolerancia de ± 2 log, aceptable

** Lejos de una exactitud adecuada aunque siga dentro del ± 2 log, inaceptable. Sólo 29 de cada 100 ufc presentes de *S.aureus* son detectadas con B.Parker (o con RPF). Sólo 9 de cada 100 ufc presentes de *Cl.perfringens* son detectadas por Filtración con TSC Agar.

*** Fuera de rango del ± 2 log, sólo 2 de cada 100 ufc presentes son detectadas, por lo que declaramos invalidado el método oficial del m-CP Agar, que desaconsejamos.

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

En cuanto a la precisión, en todos los casos está dentro de los límites marcados por los estadísticos de ± 2 log, excepto el m-CP Agar que lo roza. La proporción de datos aberrantes fuera de rango, es máxima también en el m-CP Agar (100%), seguidos por el BCYE (43%) y por el TSC (43%). Destaca también la máxima precisión de las Compact-Dry-Plates®-TC (0% de muestras aberrantes) seguida del YEA-Cromogénico (3% de muestras fuera de rango, a ambas temperaturas), mientras en el método de referencia con YEA hay nada menos que un 22 % (a 22 °C) y un 19 % (a 35-37 °C) de muestras del estudio que se han tenido que descartar por ofrecer resultados aberrantes, fuera de rango.

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

❖ CONCLUSIONES

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

a) Los caldos selectivos y/o cromogénicos y/o revitalizantes: Pseudomonas P/A, caldo GVPC previo a la aplicación de la Norma ISO 11731, Estafilococos P/A, Salmonella-Shigella Broth, MCC Colicult P/A, Enterocult P/A y Clostricult P/A. Todos ellos muestran mejor sensibilidad, especificidad y límite de detección que los métodos clásicos de referencia, como resultado de años, casi décadas, de trabajo intercolaborativo e intercomparativo, que avalan la máxima eficacia de todos ellos. El método de revitalización con caldos selectivos como los P/A de MICROKIT, demuestra lo acertado de dicho protocolo para poder detectar los microorganismos diana, incluso cuando éstos se encuentran a muy bajas concentraciones y en presencia de innumerables interferentes o acompañantes

b) Las Compact-Dry-Plates® maximizan la sensibilidad, la especificidad, la exactitud y la precisión, al ahorrar el punto crítico de la siembra en masa por refusión de agares, que en el método clásico, a menudo convierte en inviables, por exceso de calor, a los microorganismos diana. Quedan validadas las Compact-Dry-Plates®-TC para recuento de aerobios (no obstante ampliaremos la validación en breve mediante otro estudio intercolaborativo cuyos resultados ya nos han sido entregados) y las Compact-Dry-Plates®-EC para coliformes y *E.coli*. Y siguen en fase de validación, con excelentes perspectivas, las Compact-Dry-Plates®-XSA para *Staphylococcus aureus* y las Compact-Dry-Plates®-ETC para Enterococos fecales.

c) El Agar Cromosalm, aumenta de forma muy significativa la sensibilidad y la especificidad de los agares clásicos de Salmonella y de otros modernos medios cromogénicos, ahorrando al laboratorio confirmaciones innecesarias de microorganismos que no son el que buscamos.

2-Todos los métodos MICROKIT aquí expuestos, utilizados al pie de la letra con nuestros medios y kits, e independientemente de sus presentaciones, quedan validados porque son, al menos, tan fiables como el método de referencia con el que se han comparado, y lo cierto es que su mayoría lo son incluso más. Detectan y/o recuentan, en todos los casos, las concentraciones adecuadas de todos los grupos de microorganismos estudiados: Aerobios totales, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, Coliformes, *E.coli*, Enterococos fecales y *Clostridium perfringens* y sus esporas. Además, lo hacen como mínimo, tan bien como el método de referencia, demostrando unas muy superiores sensibilidad y especificidad, una mayor cercanía al límite de detección mínimo necesario, así como mejor robustez, facilidad de uso y economía que el método de referencia, en su implantación en los distintos laboratorios que los aplican.

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

4-La escasez de falsos negativos o máxima sensibilidad, aconseja utilizar estos métodos como screening negativo, sobre todo cuando se requiere el despistaje de un alto número de muestras negativas, confirmando sólo los presuntos positivos por prudencia, mediante estría en un agar adecuado como demuestran ser los expuestos en este estudio de validación. La mayor facilidad de uso del método P/A permite realizar muchas más muestras sin necesidad de aparatos de filtración, al tiempo que se disminuye el número de puntos críticos del análisis y por tanto se aumenta su robustez.

5-Hemos demostrado en otros estudios similares de validación, que los métodos de detección y recuento de Enterococos fecales en aguas, son mucho más robustos que los métodos de detección de Coliformes y *E.coli* en aguas, sean cuales sean los laboratorios y los métodos de búsqueda de este otro indicador de contaminación fecal (sea método de referencia o sea método MICROKIT P/A Enterocult). Sin embargo en la presente validación, al incluir datos más recientes, no observamos diferencias importantes entre la calidad de ambos parámetros. Sin embargo, el hecho de la muy superior longevidad de los Enterococos fecales en el agua (según bibliografía, 1-2 semanas contra 1-2 días de *E.coli*), nos invitan a proponer la implantación de su búsqueda con una frecuencia al menos tan importante como la búsqueda de Coliformes y *E.coli*, es decir, rutinariamente y a diario, a fin de conocer el auténtico estado de riesgo del agua. Por otra parte, diferenciar los Enterococos fecales de los estreptococos fecales nos parece un academismo nada práctico, ya que en realidad ambos son indicadores de contaminación fecal (sobretudo humana o sobre todo animal) y sirven al mismo fin.

6-La detección de *Clostridium perfringens* y sus esporas, por ser indicadoras de posible presencia de Enterovirus y protozoos como Cryptosporidium, Entamoeba y Giardia, no puede dejar de imponerse sólo porque el método oficial del m-CP y el oficioso del TSC sean tan poco adecuados, a causa probablemente del stress provocado por la filtración de membrana en los anaerobios estrictos. Máxime cuando existen métodos mucho más adecuados, como hemos demostrado para Clostricult P/A. El empleo de caldo P/A Clostricult aumenta en casi un 63% la sensibilidad en la detección de *Clostridium perfringens* en muestras complejas, con respecto al uso de filtración de membrana con Agar m-CP; y en más de un 21% con respecto al uso de filtración de membrana con Agar TSC. De modo que hasta un 63% de muestras con este patógeno e indicador presente, pueden no ser detectadas con el método oficial actual, ni siquiera hasta un 21% de ellas con el método oficioso que han asumido muchos laboratorios al comprobar por sí mismos la extrema ineficacia del Agar m-CP.

7-El empleo de caldo P/A Pseudomonas aumenta en más de un 26% la sensibilidad en la detección de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras complejas, con respecto al uso de filtración de membrana con Agar Cetrimida CN. De modo que hasta un 26% de muestras con este patógeno presente, pueden no ser detectadas con el método oficial actual.

8-El empleo del caldo GVPC Legionella antes de aplicar la ISO 11731 aumenta en más de un 45% la sensibilidad en la detección de *Legionella pneumophila* en muestras complejas, con respecto al uso directo de filtración de membrana con Agar GVPC sin ese paso previo. De modo que hasta un 45% de muestras con este patógeno presente, pueden no ser detectadas con el método oficial actual. También el aumento del límite de detección desde cerca de 1000 hasta 50 ufc/litro, es un gran avance en el análisis de este peligroso microorganismo.

9-El empleo de caldo P/A Estafilococos aumenta en un 29% la sensibilidad en la detección de *Staphylococcus aureus* en muestras complejas, con respecto al uso de filtración de membrana con Agar Mannitol o Baird Parker o RPF. De modo que hasta un 29% de muestras con este patógeno presente, pueden no ser detectadas con el método oficial actual.

10-El uso de Cromosalm Agar aumenta en más de un 26% la sensibilidad en la detección de *Salmonella spp.* en muestras complejas, con respecto al uso de las Normas ISO 6340 o ISO 6579. De modo que hasta un 26% de muestras con este patógeno presente, pueden no ser detectadas con el método oficial actual.

11-El empleo de caldo Salmonella-Shigella podría aumentar en un 67% la sensibilidad en la detección de *Shigella* en muestras complejas, con respecto al uso de la Norma 21567 o adaptaciones de las ISO de Salmonella. De modo que hasta un 67% de muestras con este patógeno presente, pueden no ser detectadas con el método oficial actual. Los resultados no son todavía concluyentes, pero apuntan en esa dirección.

12- Robustez, exactitud y precisión deficientes de ciertos métodos: El número de muestras cuyos recuentos estaban fuera de rango es excesivo en el Agar GVPC, en el Agar TSC y sobre todo en el Agar m-CP, habiendo quedado éste invalidado porque además su sensibilidad, exactitud y precisión son casi nulas. El TSC además detecta muy por debajo de los recuentos reales, menos del 10% de la carga real de los mismos, por lo que no podemos aconsejarlo para recuentos en aguas. De igual forma el agar Baird Parker detecta muy por debajo de los recuentos reales, menos del 29% de su carga real y no debería emplearse en análisis de aguas. El Agar GVPC recuenta en demasiadas ocasiones por debajo de 2 log del valor inóculo, de ahí la muy deficiente sensibilidad en su detección. El Agar YEA Nutriente obtiene demasiadas muestras fuera de rango (>20 %) con respecto a sus homólogos YEA-Cromogénico y Compact-Dry-Plates®-TC, probablemente por confusión entre lo que son colonias y lo que no lo son, lo cual no puede suceder en los dos cromogénicos comparados.

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

14- Confiamos que todo este trabajo, fruto de un tremendo esfuerzo conjunto en los 7 últimos años por parte de 70 de los muchos laboratorios de toda España que utilizan algunos de los métodos, medios y/o kits de MICROKIT, sea bien aceptado por las entidades de acreditación, normalización e inspección. Todo ello en aras a una mejora de la calidad analítica y del menor coste y derroche para los laboratorios y el medio ambiente que estos métodos implican. Ello incentivará que desde esta empresa podamos seguir diseñando en España métodos más eficientes para otros parámetros microbiológicos y evitará que los laboratorios acreditados ISO 17025 y los autorizados por Sanidad, se estanquen en métodos clásicos que hemos demostrado cómo son muy optimizables, gracias a un concepto que nunca debe olvidarse en ningún laboratorio: la mejora continua sin trabas burocráticas que la limiten.

❖ ANEXO FOTOGRÁFICO



Compact-Dry-Plates® TC



Pseudomonas aeruginosa P/A Broth
MICROKIT®



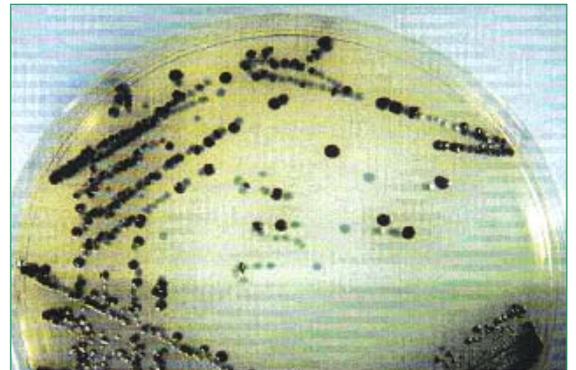
Legionella pneumophila GVPK Broth
MICROKIT®



Staphylococcus aureus P/A Broth
MICROKIT®



SS Broth MICROKIT®



Chromosalm Agar MICROKIT®



Enterocult
P/A Broth
MICROKIT®



MCC Colicult P/A Broth MICROKIT® Compact-Dry-Plates® EC



Clostricult
P/A Broth
MICROKIT®

❖ BIBLIOGRAFÍA

- ✚ REAL DECRETO 1074/2002 de 18 de Octubre sobre aguas de bebida envasadas. BOE 29.10.2002
- ✚ REAL DECRETO 140/2003 de 7 de Febrero sobre Calidad de Aguas de Consumo Humano. BOE 21.02.2003
- ✚ REAL DECRETO 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).
- ✚ Norma ISO/CD 6461-2:2002 Water quality-Detection and Enumeration of *Cl.perfringens*
- ✚ Norma ISO 6340. Water quality-Detection of Salmonella species.
- ✚ Validación del medio cromogénico de MICROKIT® para Salmonella (Chromosalm) mediante un estudio intercolaborativo. Jorge Sanchis Solera, Laboratorios MICROKIT y otros 14 autores. TECNICAS DE LABORATORIO 281, Mayo 2003.
- ✚ 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. TECNICAS 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. TECNICAS DE LABORATORIO 312, Junio 2006.
- ✚ Informes SEILAGUA® 1 a 30 (Total: 1.110 páginas), Laboratorios MICROKIT, Abril-2002 a Julio-2009
- ✚ 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 operarios 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, Idem, incluido CD con hojas de cálculo en Excel.
- ✚ Orden SCO/778/2009 de 17 de Marzo sobre métodos alternativos para el análisis microbiológico del agua de consumo humano, BOE 78 de 31-Marzo-2009
- ✚ Certificado de Validación y estudio de equivalencia de Laboratorios MICROKIT sobre MUGPLUS Agar y MCC Colicult Broth (incl. kits P/A) para coliformes y *E.coli*. Marzo de 2009.