

INFORME DE VALIDACIÓN CUALITATIVA
INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE *PATÓGENOS*
IMPLICADOS EN RETIRADAS DE MERCADO DE COSMÉTICOS, MEDIANTE
CUP12A Y OTROS 9 MEDIOS DE CULTIVO CLÁSICOS Y NOVEDOSOS

INDICE:

1-Objetivos

2-Alcance

3-Parámetro microbiológico a validar

4-Diseño del experimento

5-Herramientas utilizadas

6-Procedimiento

7-Resultados

8-Estudio estadístico de los datos (sensibilidad, especificidad, eficacia relativa, límite de detección, conformidad, concordancia, robustez)

9-Validación con 9 meses de muestras naturales

10- Conclusiones, calificación final de la validación según los resultados estadísticos y decisión

11-Bibliografía

12-Personas que han intervenido en la validación, cargos, fechas y Firmas

ANEXOS: Fotografías de la validación

1. Objetivos

Comprobar si el método de detección de *Patógenos implicados en retiradas de mercado de cosméticos* utilizado en nuestro laboratorio KosmLab de análisis microbiológicos de productos cosméticos (método Seilaparfum), comparando el nuevo CUP12A con los demás medios que también se emplean, detecta estos microorganismos adecuadamente en las muestras procesadas. Es decir, comprobar que la técnica utilizada, los medios de cultivo, equipos e instalaciones utilizados, así como los analistas que desarrollan el control rutinario de detección de *Patógenos implicados en retiradas de mercado de cosméticos*, son idóneos, con resultados aptos y fiables, determinados mediante la sensibilidad, la especificidad, la eficacia relativa, el límite de detección, la conformidad y la concordancia de nuestro método con respecto a los mismos parámetros estudiados en los métodos ISO de microbiología cosmética, en nuestras muestras de cosméticos variados.

Somos conscientes de los mediocres resultados que se obtienen en cosmética cuando se siguen las Normas ISO de microbiología cosmética (ISO 21148, ISO 21149, ISO 16212, ISO 18416, ISO 22717, ISO 22718, ISO 21150), ya que al participar en intercomparación desde hace 15 años (bajo 3 organizadores diferentes) y ver los resultados de los participantes, logramos una visión más fría, más responsable, desde “fuera del bosque”. Los numerosos falsos negativos (muy mala sensibilidad) en los participantes que las siguen, contrastan con los excelentes resultados de los laboratorios que siguen protocolos más modernos (Protocolo Seilaparfum), precisamente derivados de estas intercomparaciones. Los motivos son varios, sobre todo:

1-Uso en ISO de caldos inactivadores (Eugon, Lethen, Dey/Engley...) que no están formulados para multiplicar todos los patógenos (fallan gravemente en hongos), ni tampoco para neutralizar todos los conservantes empleados actualmente por la industria cosmética,

2-Enriquecimiento acortado en ISO a 18-24h a 35°C en patógenos que no se multiplican hasta transcurridas 36-48h a 35°C,

3-Uso de muestras mínimas en ISO no representativas en matrices tan inhibitorias como son los cosméticos (en realidad se analiza 1 g en los patógenos, en lugar de los 10 g que analizamos aquí),

4-Uso en ISO de medios selectivos, diseñados para matrices muy ricas en acompañantes (alimentos) que no existen en cosméticos. O bien diseñados para matrices donde la microbiota está en fase exponencial de crecimiento (microbiología clínica), no en fase letárgica como está en los cosméticos. Estos medios han quedado invalidados en intercomparación, algunos incluso en Farmacopea.

Por todo ello, tras un enriquecimiento de 40 h a 35°C en el caldo universal de inactivación de conservantes y enriquecimiento (LPT Neutralizing Broth de MICROKIT) a la dilución [-1] y a la dilución [-2], realizaremos en paralelo en la validación (aparte de las estrías en los agares de aislamiento propuestas en las Normas ISO antes indicadas sobre microbiología cosmética), siembras en los otros medios que según dichos servicios intercomparativos funcionan mucho mejor, así como en la más reciente creación de MICROKIT para los demás patógenos que habitualmente no se buscan en cosméticos (pero son los causantes de la mayoría de retiradas de mercado por problemas microbiológicos): el CUP12A; y así podremos elegir, según sean los resultados en la gama completa de cosméticos contrastados, con qué medios nos quedamos para nuestros análisis a partir de ahora.

Este tipo de validación se denomina “método de pares” al contrastar no sólo con las cepas de referencia de concentración e identidad conocidas, sino sobre todo, al comparar los resultados entre ambos métodos. Y además es una validación de muestras inoculadas con cepas conocidas a concentraciones conocidas.

Añadiremos a esta validación, otra realizada en más de 200 muestras naturales comparadas en nuestro laboratorio Kosmlab durante 2022. Este otro tipo de validación, también de pares, es más fiable porque ahorra el sesgo creado por la elección subjetiva de las cepas del método de muestras inoculadas, pero cuesta mucho más tiempo reunir suficientes muestras positivas (en este caso han sido 9 meses en vez de 1 semana del método anterior).

2. Alcance

Las muestras de cosméticos de cualquier tipo analizadas en nuestro laboratorio.

3. Parámetro microbiológico a validar

El parámetro objeto de la presente validación es la detección de todas las cepas de **Patógenos implicados en retiradas de mercado de cosméticos**, tras 36-48 horas de enriquecimiento a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ simultánea a la inactivación de conservantes en nuestro caldo LTP Neutralizing Broth. Seguidos de estría en placa de los medios estándar (ISO) y de los medios recomendados en los intercomparativos Seilaparfum; e incubación de dichos medios a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ durante 36-48 horas. Ya que los agares rápidos que detectan en 18-24h (sobre todo para *E.coli*-coliformes, complejo *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans* y Enterococos fecales) no nos ahorran el tener que seguir incubando hasta las 36-48 h los demás medios para los demás patógenos (*Pseudomonas aeruginosa*-*Ps.putida*, *Staphylococcus aureus*-patógenos-coagulasa positivos, Enterobacterias patógenas aparte de las coliformes patógenas, *Aspergillus spp.* patógenos) y por ello resulta más cómodo incubar y leer todos juntos a las 40-48h.

Ya existe una Norma ISO tan pretenciosa como este método (la ISO 18415 de detección de microorganismos específicos y no específicos), pero tiene un problema serio: tras el enriquecimiento, propone la estría en un medio no selectivo (TSA), lo cual hace perder mucho tiempo a sus escasos usuarios en confirmaciones, para que luego las colonias crecidas resulten mayoritariamente no ser patógenos.

4. Diseño del experimento

Analizaremos con el método más habitual del mercado (las Normas ISO de microbiología cosmética antes indicadas), duplicado con el método mejorado (Protocolo Seilaparfum). De la forma en que lo hacemos siempre en los análisis rutinarios. Un número de muestras suficiente que, previamente (a diferencia de lo que se hace en los análisis normales), habremos contaminado con cantidades conocidas muy precisas de microorganismos diana, interferentes y acompañantes. Así podremos comparar los resultados finales obtenidos con los resultados esperables (al emplear a la vez cepas cuantitativas) y aplicar las técnicas estadísticas adecuadas, lo más inteligibles posible, para evaluar el nivel de efectividad. Éste se podrá calcular mediante los parámetros estándar de validación cualitativa (Sensibilidad, Especificidad y Límite de detección, así como la Conformidad o Concordancia, o probabilidad de iguales

resultados en muestras idénticas analizadas por los diferentes analistas). De este modo podremos tomar la decisión según el método mejorado quede o no quede validado en nuestro laboratorio (es decir, la Sensibilidad, la Especificidad, el Límite de detección, la Conformidad y la Concordancia, cumplan con los estándares internacionales de aceptabilidad). Y todo ello con los tipos de muestras que analizamos habitualmente, con nuestros equipos, con nuestros medios de cultivo, en nuestras instalaciones, mediante nuestros analistas... con una demostración basada en el método científico y en pruebas documentales.

El número de muestras elegido para esta validación se podría haber calculado de acuerdo con el criterio estándar de ser mayor o igual a la raíz cúbica del número de muestras que analizamos anualmente, por lo que al ser éstas menos de 1000, un número de 10 sería el adecuado. Sin embargo, al parecer nos muy pocas, elegiremos un término intermedio entre dicho criterio y el otro, menos extendido, de elegir la raíz cuadrada del número de muestras, de modo que de 1000 muestras analizadas al año, la raíz cuadrada serían 32 muestras para la validación. El número intermedio entre 10 y 32 preferimos que sea de 20, ya que con dicho número, 1 fallo de 20 muestras positivas ó 1 fallo de 20 muestras negativas representan respectivamente el 5%, justo la proporción de muestras que internacionalmente se considera como valor máximo aceptable de errores (tanto en falsos positivos como en falsos negativos) en ensayos cualitativos. Realizaremos pues el análisis de validación en 20 muestras contrastadamente negativas (para calcular la *Especificidad*, o escasez de falsos positivos) y en 20 muestras duplicadas contrastadamente positivas (para calcular la *Sensibilidad*, o escasez de falsos negativos) y en 20 muestras con un mix de todos los patógenos. Todos los inóculos estarán a concentración 10-100 ufc/inóculo. Consideraremos duplicados de muestras a ambos métodos, para poder calcular la precisión en forma de la componente *Concordancia*. Y añadiremos los negros (cepas sin muestra directamente inoculadas en placas) para verificar si la concentración empleada de las cepas coincide con la del certificado del proveedor (para, de no ser así, tener en cuenta el recuento actual más que el certificado y aplicar el factor de corrección que sea necesario al valor de los inóculos teóricos). Estas muestras negras no es necesario que sean 20, podemos hacer por ejemplo 2 para cada cepa, en los medios de cultivo de la validación y/o los del certificado del proveedor, elaborando así todas estas placas de negros también en duplicados de placas y de medios.

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

Empleamos muestras naturales, sin irradiar, y después inoculadas con los microorganismos conocidos a concentraciones conocidas, ya que la presencia previa de patógenos que pudiese interferir en la validación (en los negativos) es muy poco probable.

El estudio se realiza en realidad con 120 placas para cada microorganismo: 20 positivas del medio ISO, 20 positivas del medio optimizado, 20 negativas del medio ISO, 20 negativas del medio optimizado), 20 positivas con el mix de todos los patógenos en el medio ISO y 20 positivas con el mix de todos los patógenos en el medio optimizado. Al no ser una validación cuantitativa (para recuentos), no se precisan duplicados de placas por cada muestra. Se trata de la validación más ambiciosa de cuantas hemos realizado en los últimos 24 años (desde 1999), ya que están implicados nada menos que 12 medios de cultivo de aislamiento en placa (60 placas por medio), que representan 720 placas. El número de datos finales será más que suficiente, lo que nos permitirá después aplicar una estadística más simple y comprensible para todos. En realidad se trata de 10 medios, pero el más novedoso y útil de todos (el CUP12A) se emplea en tres formatos diferentes para ampliar su validación a todos los niveles: placa de 90 mm, plaquita hermética de 55 mm y DryPlates.

Previamente habremos inoculado en las matrices elegidas de cosméticos, lo más variados posible, las cepas concretas (cuantitativas, de referencia, trazables, con indicación de su precisión inicial), siguiendo el método que queremos validar, así dopado con cepas de referencia, lo que nos permitirá conocer el valor esperable, para así compararlo con el valor obtenido en cada uno de los dos métodos contrastados, y poder tomar decisiones acordes a los criterios de aceptabilidad estándar. Las cepas usadas persiguen el objetivo de emplear especies bacterianas interferentes y acompañantes en las muestras, además de los microorganismos diana. Para mejorar la Inclusividad en la Selectividad del método, hemos empleado 2-3 cepas **diana** diferentes en los parámetros donde éstas se mencionan en la ISO 11133-2 sobre control calidad de los medios de cultivo; y para mejorar la Exclusividad en la Especificidad del método, hemos empleado varios interferentes (cepas no-diana que puedan llegar a interpretarse como falsos positivos).

Las diferentes cepas **acompañantes** elegidas permiten contrastar las sinergias/antagonismos en el crecimiento de los patógenos diana, ya que el enriquecimiento se hace en caldo general, no selectivo, porque ha de servir para todos los patógenos a la vez. Aunque su morfología colonial sea muy diferente a la diana o incluso no crezcan en la placa, su labor es demostrar si interfieren en el crecimiento de las diana.

La diferentes cepas **interferentes** elegidas, tienen características bioquímicas y de crecimiento en placas de los medios empleados similares a las diana, y las inoculamos a una concentración similar a las dianas, para contrastar la frecuencia de falsos positivos en cada medio, los cuales hacen perder el tiempo al laboratorio en confirmaciones.

Ya que si sólo eligiésemos diana, o si los acompañantes fuesen inviables en los medios usados, o si añadiésemos cantidades elevadas de diana y bajas de interferentes o acompañantes, la validación quedaría en entredicho, al no ponerse en el peor de los casos (incluso en cosméticos donde la probabilidad de encontrar tanta flora es muy escasa).

Se calculan cuántos ml y de qué concentración del banco de diluciones se debe partir para obtener finalmente en las muestras positivas, un número lo más cercano posible al mínimo ideal de 50 ± 10 ufc de las dianas por gramo o mililitro de la muestra. Y se consigue que todas las cepas estén en valores entre 10 y 100 ufc/inóculo que se añade a los 10 g de muestra, de modo que se demuestre la capacidad de detectar desde 1-10 ufc/g. Para estudiar la sensibilidad y la especificidad, sería muy

imprudente intentar llegar a 1 ufc/g (en lugar de 1-10 ufc/g), porque la incertidumbre microbiológica nos asegura que por debajo de este número habrá diversas alícuotas de 1 g ó ml con 0 ufc, aunque estemos toda la mañana agitando para homogeneizar la muestra cuya media es de 5 ufc/g ó ml, lo cual impediría demostrar lo que necesita demostrar una validación). Esto nos permite demostrar que el límite de detección es 1 ufc de patógeno/g, ya que no tiene sentido conseguir todos los inóculos con sólo 1 ufc/g, sería imposible, porque la incertidumbre en la homogeneidad microbiológica nos impide siempre demostrar niveles tan bajos), ya que lo queremos demostrar en esta parte del experimento es hasta qué concentración más baja la incertidumbre microbiológica nos deja comprobar que somos capaces de detectar, aunque el límite inferior de cuantificación de un método de estría tras enriquecimiento sería teóricamente de 1 ufc/g ó ml). Es decir, si demostramos experimentalmente que el método es capaz de detectar desde 10 ufc/g, se debe aceptar que también será capaz de detectar 1 ufc/g, aunque en el experimento no podamos conseguirlo, porque aunque estemos todo el día agitando una solución de 100 ufc en 100 ml, jamás conseguiremos que haya 1 ufc en cada ml, dada la distribución “contagiosa” (o de Poisson o binomial negativa) que todos los microorganismos experimentan en cualquier matriz a causa de sus uniones entre varias células mediante exopolisacáridos extracelulares (de ahí el concepto de ufc).

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

Que equivale a la regla de tres simple, para ver cuántos µl de inóculo necesitaremos por cada muestra y cuantos ml de inóculo de cada cepa necesitaremos para el total de muestras. Por ejemplo, si tenemos *Staphylococcus aureus* a concentración $(6 \pm 2.68)10^3$ ufc/lentícula, al añadir esa lentícula en 10 ml de Ringer, la concentración de este primer tubo (dilución 0) será de $6 \pm 2.68 \times 10^2$ ufc/ml. Haciendo una primera dilución del tubo madre en 9 ml de Ringer, obtendremos $6 \pm 2.68 \times 10^1$ ufc/ml, (60 ± 26.8) ufc/ml, así que necesitamos inocular 1 ml en cada muestra positiva de 10 g para obtener 6 ufc/g. En este ejemplo, si vamos a necesitar inocular 1 ml de esta dilución -1 en cada muestra y tenemos 20 muestras positivas, necesitaremos 20 ml (2 tubos Ringer 10 ml de esta dilución), así como otro tanto para las 20 muestras del mix de positivos.

Por ello estos cálculos y su revisión requieren la mayor concentración y se realizan en días previos al día del experimento de validación.

Las cepas diana se siembran siempre después de las demás: en el caso de las validaciones cualitativas, para evitar contaminaciones en las muestras negativas; en el caso de las validaciones cuantitativas, además, para minimizar el tiempo durante el cual podrían multiplicarse a la espera durante el experimento.

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

El experimento se inicia el domingo día 30 de Octubre de 2022, tras incubar 2 días los caldos LPT Neutralizing Broth se estría cada tubo en las placas de los 10 medios de aislamiento (el martes 1 de Noviembre de 2022) y los resultados se leen el jueves día 3 de Noviembre de 2022. El informe con todos los datos finales se acaba de redactar, el miércoles 9 de Noviembre de 2022.

5. Herramientas utilizadas

5.1 Material de laboratorio e instrumental necesario

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

- Micropipeta rango 100 - 1000µL
- Micropipeta rango 10 - 100µL
- Puntas para micropipeta de ambos tipos
- Agitador Vórtex
- Estufa a 32,5 °C ± 2,5°C
- Nevera
- Congelador de nevera para las cepas
- Tubos de vidrio estériles con tapón a rosca hermético de aluminio
- Alcohol de 70° o toallitas desinfectantes, Airesano para después de los crecimientos
- Cabina de flujo laminar
- Balanza para muestras de 10 ± 0,1 g

5.2 Medios y diluentes utilizados

Medios y kits de MICROKIT	Lote y caducidad
LPT Neutralizing Broth deshidratado (LPTB), frascos y tubos	2209/3941-6, 21/09/2024
Ringer 10 mL y 9 mL para las diluciones de las cepas	2209/3950-6, 28/09/2024
Biggy Nickerson Candida Agar, plaquis® herméticas	2210/3955-6, 03/03/2023
Sabouraud Dextrose Caf Agar, plaquis® herméticas	2210/3957 6, 03/03/2023
Baird Parker con yema de huevo y telurito K, plaquis® herméticas	2210/3958 6, 03/03/2023
X-Staph Agar, plaquis® herméticas	2210/3957 6, 03/03/2023
MugPlus Cfs Agar, plaquis® herméticas	21188-37, 07/02/2023
Mac Conkey Agar, plaquis® herméticas	2210/3957-6, 05/03/2023
Burkholderia CBCSA Agar, plaquis® herméticas	2210/3957 6, 05/03/2023
Burkholderia BCPT Agar, plaquis® herméticas	2210/3957 6, 05/03/2023
Cetrimide Agar, plaquis® herméticas	2210/3959-6, 07/03/2023
CUP12A, plaquis® herméticas	2210/3958 6, 07/03/2023
CUP12A, placas 90 mm	2210/3960 6, 07/03/2023
CUP12A, DryPlates®	2210/3954-6, 07/09/2023

No se emplean kits de confirmación en la presente validación, ya que conocemos cuales son los microorganismos añadidos, son las propias cepas en lentícula que comercializamos en MICROKIT.

5.3 Material biológico utilizado

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

29 Dianas para las muestras positivas y para el mix de muestras positivas (todas patógenos del Grupo de riesgo biológico 2, e implicadas en retiradas de mercado de productos cosméticos), del cepario actualizado de lentículas cuantitativas MICROKIT:

WDCM 00053	<i>Aspergillus niger brasiliensis</i>
WDCM 00001	<i>Bacillus cereus</i> ,
MKTA 25416	<i>Burkholderia cepacia</i>
DSMZ 50181	<i>Burkholderia cepacia</i>
MKTA BAA-245	<i>Burkholderia cenocepacia</i> BC complex (Pharmacopea 2019)
MKTA BAA-247	<i>Burkholderia multivorans</i> BC complex (Pharmacopea 2019)
WDCM 00054	<i>Candida Albicans</i> Pharmacopea
WDCM00006	<i>Citrobacter freundii</i>
WDCM00175	<i>Enterobacter aerogenes</i>
WDCM00087	<i>Enterococcus faecalis</i>
WDCM00013	<i>Escherichia coli</i> 25922
WDCM 00196	<i>Escherichia coli</i> Pharmacopea
WDCM00090	<i>Escherichia coli</i>
WDCM00012	<i>Escherichia coli</i>
WDCM 00206	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (=K.aerogenes, = K.variicola)
MKTS-BCN1	<i>Pantoea agglomerans</i> ,
MKTD-9245	<i>Pluralibacter gergoviae</i>
WDCM00023	<i>Proteus mirabilis</i>
WDCM00025	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
WDCM00026	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027 Pharmacopea
WDCM00117	<i>Pseudomonas putida</i>
WDCM 00030	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> (S.enteritidis)
MKTD30121	<i>Serratia marcescens</i> ,
MKTS-SH01	<i>Shigella flexneri</i>
WDCM00034	<i>Staphylococcus aureus</i> .
WDCM00131	<i>Staphylococcus aureus</i> .
WDCM00032	<i>Staphylococcus aureus</i> Pharmacopea
PECJJT	<i>Staphylococcus hominis</i>
WDCM00159	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

6 No-dianas (acompañantes e interferentes) para los negativos (todos los inocuos del Grupo de riesgo biológico 1), del cepario actualizado de lentículas cuantitativas MICROKIT:

WDCM 00003	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>
MKTS-KF	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (= <i>Candida kefir</i>)
CCCTM12	<i>Micrococcus luteopaisa</i>
MKTS-P069	<i>Penicillium digitatum</i>
MKTM-R001	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
MKTS-PB2	<i>Saccharomyces boulardii</i> ,

5.4 Muestras empleadas

Nº	PRODUCTO COSMÉTICO CONCRETO
1:	Jabón gel de manos manzana Sanko
2:	Dentífrico niños, sabor chicle fresa Licor del Polo
3:	Toallitas bebé Huggies
4:	Crema hidratante rosa mosqueta Skin
5:	Desodorante en bola Babaria
6:	Gel de baño exfoliante melocotón Cosmia
7:	Agua micelar Mussvital
8:	Loción corporal reafirmante Nivea
9:	Enjuague bucal menta Licor del Polo
10:	Protector solar factor 50 Babaria
11:	Aceite para bebés Johnsons
12:	Acondicionador aceite de pistacho Garnier
13:	Toallitas desmaquillantes Interapotek
14:	Champú camelias Klorane
15:	Mascara facial al Neem y Cúrcuma Himalaya
16:	Desodorante barra Hugo Boss
17:	Agua de peinado Auchan
18:	Gel depilatorio Dieth Estetic
19:	Espuma de afeitar Nivea Men
20:	After Sun Babaria

6. Procedimiento:

Operativa con las muestras inoculadas.

La técnica seguida en el experimento se puede resumir de la siguiente manera:

Primero se verifica que las propiedades organolépticas (aspecto, olor) de las matrices es correcto, sobre todo si se tratase de matrices que hubiéramos tenido que irradiar para eliminar flora desconocida (lo cual no suele ser necesario en cosméticos).

- Preparamos un triplicado de 20 botes estériles, cada uno con 90 mL de LPTB y 10 g de la misma muestra (total 20 muestras triplicadas diferentes, 20 negativas para especificidad, 20 positivas para sensibilidad, y 20 positivas con todo el mix de patógenos para sensibilidad con la componente sinergia/antagonismo. No necesitamos muestras para calcular el límite de detección, ya que un método de estría tras enriquecimiento ya es el oficial en la búsqueda de patógenos y se presupone que el límite de detección es desde 1 ufc/inóculo),
- Preparamos 60 placas de cada medio, así como varias placas adicionales de cada uno de los medios para los negros de cepas sin muestra cosmética. Para ello, tomamos las muestras de las cepas para plaquear directamente de su dilución más idónea y conocer los aspectos coloniales característicos de cada cepa en estos medios, así como la concentración real actual de cada cepa patrón, por si acaso es ahora muy diferente a la certificada por el proveedor en origen. Y por fin, realizamos un blanco de muestra-mix sin cepas inoculadas, para contrastar que las matrices no contenían en origen los microorganismos diana (sólo si no se irradiaron o si no se trata de cosméticos, donde la probabilidad de contener patógenos positivos es ínfima).
- Reconstituimos las cepas de laboratorio en tubos de 10 ml de Ringer marino. Con meticulosidad para no perder ninguna de las lentejas que conforman las mismas, para que no se queden pegadas a las paredes del tubo (lo que dificultaría y retrasaría su disolución) y bajen al fondo,

dejando 10 minutos que se empapan y agitando después con un vórtex para conseguir una correcta homogeneización.

- Hacemos los cálculos para determinar la cantidad de inóculo que se deberá traspasar a cada bote con muestra, para conseguir la cantidad de ufc que queremos en cada ml final (10-100 ufc/ml). Aunque sea una validación cualitativa, sin cepas cuantitativas precisas no podríamos saber cuál es el valor inóculo ni por tanto ver cuál es el límite de detección que somos capaces de detectar. Tampoco podríamos inocular los interferentes y acompañantes a niveles contrastadamente superiores a los valores de los microorganismos diana. Es necesario diluir más las cepas de alta concentración pasando 1 ml del tubo inicial de 10 ml a un tubo de 9 ml de Ringer marino y así sucesivamente hasta conseguir la concentración deseada por cada ml de muestra (que recordemos, se añadirá a 90 ml de LPT Broth con 10 g de muestra cosmética). Es más fácil partir de todas las cepas a la misma concentración exponencial para así no complicar los cálculos ni promover errores, pero esto no es siempre posible. Una vez determinado este valor, trasparamos dicho volumen de inóculo a los tubos con muestras, con micropipeta y puntas estériles. Tras ello, agitamos las muestras para su correcta homogeneización momentos antes de cada inóculo.
- Para prevenir el posible poder inhibitorio intrínseco de las muestras elegidas, realizamos de cada uno de los 60 botes con 100 mL, una dilución decimal (1 mL de los 100 en un tubo de 9 ml de LPT Broth)
- La concentración teórica obtenida de los distintos microorganismos inoculados en las **muestras negativas**, en las **muestras positivas** y en las **muestras mix de positivos**, es de 10-100 ufc/ml, tanto en los botes de 100 mL como en los tubos de 10 mL.
- Inoculamos las 20 muestras negativas (a ambas concentraciones, en bote y en tubo) con las cepas de no patógenos, las 20 muestras positivas (a ambas concentraciones, en bote y en tubo) con las cepas de patógenos y las 20 muestras “positivas mix” (a ambas concentraciones, en bote y en tubo) con el mix de cepas de patógenos.
- -Se incuban todos los botes y tubos juntos y al mismo tiempo, 48h a $32,5 \pm 2,5$ °C, las 60 muestras [-1] en bote y las 60 muestras [-2] en tubo.
- Por cada muestra incubada, esté o no turbia, realizaremos tras esos dos días de incubación, dos ensayos: uno estriando la parte izquierda de cada placa con su dilución [-1] enriquecida, desde los botes; y otro estriando la parte derecha de cada placa con su dilución [-2] enriquecida, desde los tubos. Esta labor nos lleva 14 horas de trabajo continuo, al ser un total de 20 muestras x 3 inóculos x 2 diluciones x 12 placas = 1440 estrías en las 720 placas totales. Todas las placas de medios se incuban (todas las placas juntas e introduciéndolas a la vez en la estufa) 48h a $32,5 \pm 2,5$ °C, no apilando más de 8 placas ni permitiendo que las columnas se toquen entre si, ni a las paredes/suelo/techo de la estufa.
- Sabemos que varios de los patógenos cosméticos son lentos y no crecen en 18-24h, sino que tardan 48 h en manifestarse, por eso son en total 4 días de incubación entre los 2 días del caldo de inactivación/enriquecimiento, y los otros 2 días de los agares de aislamiento. Por comodidad, los demás parámetros patógenos en los análisis se hacen de la misma forma, aunque algunos sean rápidos de 24 h de enriquecimiento + 24h de aislamiento en placa (*E.coli*-coliformes, Enterococos fecales y *B.cepacia*).

- Transcurrido el tiempo de incubación de las placas, se estudia la aparición o no de colonias típicas diana en cada placa, verificando el crecimiento o su ausencia en ambas mitades de cada placa (procedentes de la [-1] o de la [-2], para ver si encontramos correlación entre la dilución empleada y los mejores resultados. No se trata de contarlas, ya que esta es una validación cualitativa y además contar tras enriquecer no tiene el menor sentido. Se trata de ver si hay o no crecimiento típico de las cepas diana, tanto en los positivos, como en los negativos, como en el mix de positivos (sinergia/antagonismo).

7. Resultados

1) Blanco, para ver si había muestras previamente contaminadas:

Se demuestra que no hay crecimiento de las dianas en ninguna de las 20 muestras cosméticas, de modo que las matrices han sido correctamente elegidas sin ninguno de los patógenos típicos de cosméticos, para evitar la aparición de cepas sorpresa en la validación que actuarían como presunto falso positivo.

2) Placas de positivos (Negros), para ver si cada cepa estaba viable y a la concentración certificada antes de inocularla en los cosméticos:

Se demuestra que todas las cepas están en perfectas condiciones de crecimiento y a las concentraciones certificadas por el fabricante

3) Placas de negativos, para el estudio de especificidad (falsos positivos)

Los crecimientos con colonias atípicas o de colores no-diana en un medio, se consideran negativos

Ver tabla anexa en la página siguiente

A la izda es el resultado de la dilución [-1] y a la derecha el de la dilución [-2]

4h marcando placas y 6h las siembras: 60 grupos de 12 placas a ambas [diluciones]

-: negativo +: positivo ++: positivo muy abundante +, +, , +, +... se refiere al color de las colonias

4) Placas de positivos, para el estudio de sensibilidad (falsos negativos)

Los crecimientos con colonias atípicas o de colores no-diana en un medio, se consideran negativos

Sólo se puede considerar falso negativo, el medio cuya diana obtiene falta de crecimiento en AMBAS diluciones, ya que siempre trabajamos con ambas diluciones, cada una en una mitad de cada placa

Ver tabla anexa en la página siguiente a la de negativos

A la izda es el resultado de la dilución [-1] y a la derecha el de la dilución [-2]

-: negativo +: positivo ++: positivo muy abundante +, +, **+**, +, +... se refiere al color de las colonias

5) Placas de positivos mix, para el estudio de sensibilidad (falsos negativos) tras la sinergia/antagonismo de las diferentes cepas en el caldo de enriquecimiento

Los crecimientos con colonias atípicas o de colores no-diana en un medio, se consideran negativos

Sólo se puede considerar falso negativo, el medio cuya diana obtiene falta de crecimiento en AMBAS diluciones, ya que siempre trabajamos con ambas diluciones, cada una en una mitad de cada placa

Ver tabla anexa en la página siguiente a la de positivos

A la izda es el resultado de la dilución [-1] y a la derecha el de la dilución [-2]

-: negativo +: positivo ++: positivo muy abundante +, +, **+**, +, +... se refiere al color de las colonias

VALIDACIÓN CUALITATIVA PARÁMETRO: **PATÓGENOS QUE HAN PROVOCADO RETIRADAS DE MERCADO DE COSMÉTICOS**
 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 48h a 35°C en LPTb [-1] y [-3] y 48h a 35°C estría en: FECHA: 30/X al 3/XI/2022

MATRIZ COSMÉTICA	CEPAS WDCM	RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS										TABLA 1 DE NEGATIVOS		
		BIGGY	SCaf	X-STAPH	B.Parker	MUGPLUS	Mac Conkey	CBCSA	BCPT sin Abb	CETRIMID A	CUP12A Placa 90 K	CUP12A Plaqui R	DPP-CUP12	
1	<i>Bacillus subtilis subsp. Spizizenii 3</i>	-/-	-/-	+/+ verde	negras+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Blancas-/-	-/+Rojas	Rojas+/-	Rojas+/-	
2	<i>Kluyveromyces marxianus MKTS-KF</i>	Blancas-/-	+/+blancas	-/- crema	-/-	-/-blancas	+/+ rosas	+/+ rosa	Rojas +/-	-/- crema	-/-	-/-	Rojas+/-	
3	<i>Micrococcus luteopaisa CCCTM12</i>	-/-	-/-	-/-	negras+/-	-/-	-/-	-/-	-/- incol	-/-	+/+ Rojas	+/+ Rojas	+/+ Rojas	
4	<i>Penicillium digitatum MKTSP069</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Blancas-/-	-/-	-/-	-/-	
5	<i>Rhodotorula mucilaginosa MKTMR1</i>	-/-	-/+salmón	-/-	-/-	-/-	-/+Rojas	-/Rojas	-/-salmón	-/-	-/-	-/-	-/-	
6	<i>Saccharomyces boulardii MKTSPB2</i>	-/-	+/+blancas	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+Rosas	-/- crema	Blancas-/-	-/-	-/-	-/-	
7	<i>Bacillus subtilis subsp. Spizizenii 3</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Rojas+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	
8	<i>Kluyveromyces marxianus MKTS-KF</i>	-/-	+/+blancas	+/+ verde	negras+/-	-/-blancas	+/+ Rojas	+/+rosa	-/- crema	-/-	Rojas+/-	Rojas+/-	Rojas+/-	
9	<i>Micrococcus luteopaisa CCCTM12</i>	-/-	-/-	+/+ verde	negras+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Amarillas-/-	+/+ Rojas	Rojas+/-	Rojas+/-	
10	<i>Penicillium digitatum MKTSP069</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	
11	<i>Rhodotorula mucilaginosa MKTMR1</i>	-/-	+/+salmón	-/-	-/-	-/-	-/-amarilla	-/+Rosas	-/-salmón	-/- crema	-/-	-/-	-/-	
12	<i>Saccharomyces boulardii MKTSPB2</i>	-/-	+/+blancas	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+Rosas	-/- crema	Blancas-/-	-/-	-/-	-/-	
13	<i>Bacillus subtilis subsp. Spizizenii 3</i>	-/-	-/-	+/+ verde	negras+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	
14	<i>Kluyveromyces marxianus MKTS-KF</i>	-/-	+/+blancas	verde +/-	negras+/-	-/-blancas	+/+ Rojas	+/+rosa	-/- crema	-/-	-/-	-/-	-/-	
15	<i>Micrococcus luteopaisa CCCTM12</i>	-/-	-/-	+/+ verde	negras+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Amarillas-/-	Rojas+/-	-/-	-/-	
16	<i>Penicillium digitatum MKTSP069</i>	-/-	+/+blancas	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	
17	<i>Rhodotorula mucilaginosa MKTMR1</i>	-/-	+/+salmón	-/-	-/-	-/-	-/-amarilla	-/+Rosas	-/-salmón	-/-	-/-	-/-	-/-	
18	<i>Saccharomyces boulardii MKTSPB2</i>	-/-	+/+blancas	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+Rosas	-/- crema	-/-	-/-	-/-	-/-	
19	<i>Bacillus subtilis subsp. Spizizenii 3</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Rojas+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	
20	<i>Kluyveromyces marxianus MKTS-KF</i>	-/-	+/+blancas	+/+ verde	negras+/-	-/-blancas	+/+ Rojas	+/+rosa	-/- crema	-/-	-/-	Rojas+/-	Rojas+/-	
TOTAL FALSOS +		0/0 (0)	6/10 (16)	7/6 (13)	8/3 (11)	0/0 (0)	6/5 (11)	5/9 (14)	1/0 (1)	0/0 (0)	4/3 (7)	5/1 (6)	6/1 (7)	

MATRIZ COSMÉTICA	CEPAS WDCM	RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS										TABLA 2 DE POSITIVOS		
		BIGGY	SCaf	X-STAPH	B.Parker	MUGPLUS	Mac Conkey	CBCSA	BCPT sin Abb	CETRIMIDA	CUP12A Placa 90 K	CUP12A Plaqui K	DPP-CUP12	
1	<i>C.albicans</i> 54 + <i>A.niger</i> 53	+ /++ parda	+/++ blancas	Azules+/-	Negras+/-	-/-	-/-	Rosas+ /+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	
2	<i>St.aureus</i> 34	-/-	-/-	-/-	Negras++/++	-/-	-/-	-/-	-/-crema	-/-	Rojas++/+	-/-	Rojas+ /+	
3	<i>St.aureus</i> 131	-/-	-/-	Violetas+ /+	Negras++/++	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Rojas++/+	-/-	Rojas+ /++	
4	<i>St.aureus</i> 32	-/-	crema+ /-	Violetas+ /+	Negras++/++	-/-	rojas+ /-	-/-	-/-	amarillas- /-	Rojas+ /-	Rojas+ /-	Rojas+ /++	
5	<i>E.coli</i> 13 + <i>Bacillus cereus</i> 1	-/-	-/-	-/-	- /+negras	- /++azules	púrpura+ /++	- /++Rosa	Rojas+ /++ medio rosa	- /-blancas	- /rojas+	Rojas+ /++	Rojas+ /++	
6	<i>E.coli</i> 196 + <i>Proteus mirabilis</i> 23	-/-	-/-	Rosa- /-	Negras++/++	++ /++azules	fucsia+ /++	Rosas+ /+	Rojas+ /++ medio rosa	- /-blancas	Rojas+ /++	Rojas+ /++	Rojas+ /++	
7	<i>E.coli</i> 90 + <i>Serratia marcescens</i> DSMZ 30121	-/-	-/-	-/-	-/-	++ /++azules	rosas+ /++	-/-	Rojas+ /++ medio rosa	-/-	- /rojas+	Rojas+ /++	Rojas+ /+	
8	<i>E.coli</i> 12 + <i>Salmonella enteritidis</i> 30	-/-	-/-	-/-	-/-	++ /++azules	rosas+ /++	Rosas+ /+	Rojas+ /++ medio rosa	-/-	Rojas+ /+	Rojas+ /++ medio rosa	Rojas+ /++	
9	<i>K.pneumoniae</i> 206 + <i>Shigella flexneri</i> MKTSH01	-/-	-/-	-/-	- /+negras	++ /++rosas	fucsia+ /++	Rosas+ /++	- /-crema	- /-blancas	Rojas+ /++	Rojas+ /++	Rojas+ /++	
10	<i>Pluralibacter gergoviae</i> DSMZ 9245	-/-	crema+ /-	-/-	-/-	++ /++rosas	púrpura+ /++	salmon+ /++	Rojas+ /++ medio rosa	- /-blancas	Rojas+ /++ medio rosa	Rojas+ /+	Rojas+ /++	
11	<i>Enterobacter aerogenes</i> 175+ <i>St saprophyticus</i> 159	-/-	-/-	Verdes+ /+	Negras++/++	++ /++rosas	fucsia+ /++	Rosas+ /++	- /-amarillas	- /-crema	Rojas+ /++	Rojas+ /++ medio rosa	Rojas+ /++	
12	<i>Citr.freundii</i> 6 + <i>Pantoea agglomerans</i> MKTSBCN1	-/-	Blancas+ /-	-/-	-/-	- /+rosas	púrpura+ /++	- /+Rosa	Rojas+ /++ medio rosa	- /-blancas	- /rojas+	Rojas+ /++	Rojas+ /+ medio rosa	
13	<i>B.cepacia</i> ATCC 25416	-/-	-/-	Verdes+ /+ +	Negras+ /+	- /-crema	púrpura+ /++	Rosas+ /++	Rojas+ /++ medio rosa	- /-crema	Rojas+ /++ medio rosa	Rojas+ /++	Rojas+ /++	
14	<i>B.cepacia</i> DSMZ 50181	-/-	-/-	-/-	-/-	- /-blancas	púrpura+ /++	Malva+ /-	-/-	- /-blancas	Rojas+ /-	Rojas+ /++	Rojas+ /++	
15	<i>B.cenocepacia</i> ATCC BAA245	-/-	crema+ /-	Verdes+ /+	Negras+ /+	-/-	púrpura+ /-	Rosas+ /-	Rojas+ /+	- /-blancas	Rojas+ /+	Rojas+ /+	Rojas+ /++	
16	<i>B.multivorans</i> ATCC BAA247	-/-	Blancas+ /-	Rosas- /-	Negras+ /+	-/-	púrpura+ /+	-/-	- /-crema	- /-crema	Rojas+ /-	-/-	Rojas+ /+ medio rosa	
17	<i>P.aeruginosa</i> 25	-/-	crema+ /+	-/-	-/-	- /-crema	rojas+ /-	púrpura+ /++	Rojas+ /++ medio rosa	verde+ /++	Rojas+ /++ medio rosa	Rojas+ /++	Rojas+ /++	
18	<i>P.aeruginosa</i> 26	-/-	-/-	-/-	-/-	- /-crema	-/-	Rosas+ /++	Rojas+ /++ medio rosa	verde+ /+	Rojas+ /++ medio rosa	Rojas+ /++	Rojas+ /+	
19	<i>P.putida</i> 117	-/-	-/-	Violeta+ /++	Negras+ /+ +	- /-ámbar	Rojas+ /++	Rosas+ /-	- /-crema	- /-crema	Rojas+ /++ medio rosa	Rojas+ /-	Rojas+ /+	
20	<i>Enterococcus faecalis</i> 87 + <i>Staph hominis</i> PECJIT	-/-	-/-	Rosa- /-	Negras+ /+ +	- /-ámbar	púrpura+ /+	-/-	-/-	-/-	Rojas+ /+	Rojas+ /+	Rojas+ /++	
TOTAL FALSOS -		0/0 (0 de 2+)	0/0 (0 de 2+)	1/1 (2 de 6+)	0/0 (0 de 6+)	0/0 (0 de 8+)	0/0 (0 de 8+)	0/2 (0 de 3+)	1/1 (2 de 6+)	0/0 (0 de 2+)	4/4 (1 de 20+)	4/6 (2 de 20+)	1/1 (1 de 20+)	
TOTAL FALSOS +		0/0 (0 de 18-)	6/1 (6 de 18-)	5/4 (5 de 14-)	8/9 (9 de 14-)	0/0 (0 de 12-)	8/6 (8 de 12-)	8/9 (9 de 17-)	8/8 (8 de 17-)	0/0 (0 de 18-)	0/0 (0 de 0-)	0/0 (0 de 0-)	0/0 (0 de 0-)	

MATRIZ COSMÉTICA	CEPAS WDCM	RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS									TABLA 3 DE POSITIVOS MIX		
		BIGGY	SCaf	X-STAPH	B.Parker	MUGPLU S	Mac Conkey	CBCSA	BCPT sin Abb	CETRIMI DA	CUP12A Placa 90 K	CUP12A Plaqui K	DPP-CUP12
1	Mix de todas las de la tabla 2	+ / ++	+ / ++	+++	+ / ++	+++	+++	++	+++	- / +	+ / +	+++ medio rosa	+++
2	Mix de todas las de la tabla 2	+ / ++	+++	+++	++	+++	++	+ / ++	+++ medio rosa	++	++ medio rosa	+++ medio rosa	+ / ++
3	Mix de todas las de la tabla 2	++	+++	+ / ++	+ / ++	+++	++	+ / -	+++	- / +	+ / +	+++ medio rosa	+++
4	Mix de todas las de la tabla 2	+++	+++	+ / ++	+++	+++	+++	+++	+++ medio rosa	+++	+++	+++ medio rosa	+ / +
5	Mix de todas las de la tabla 2	- / +	- / ++	+ / ++	- / ++	+++	+ / ++	+++	+ / ++	+++	+++ medio rosa	+++ medio rosa	+ / ++
6	Mix de todas las de la tabla 2	- / +	+ / ++	+ / ++	+ / ++	+++	+++	+++	+++ medio rosa	++	++	+++ medio rosa	+++
7	Mix de todas las de la tabla 2	+ / ++	+ / ++	+++	+++	+++	+++	++	+++ medio rosa	++	++	+++ medio rosa	+ / ++
8	Mix de todas las de la tabla 2	+ / +	+ / ++	+++	+ / ++	+++	+++	++	+++ medio rosa	+++	+++	+++ medio rosa	++
9	Mix de todas las de la tabla 2	- / +	+ / ++	++ / -	+ / +	+++	+++	++ / +	- / -	++	++	- / +	++
10	Mix de todas las de la tabla 2	+ / ++	+ / +	+++	+ / +	+++	+++	++	- / -	+++	++	+++	+ / ++
11	Mix de todas las de la tabla 2	++	++	- / -	+ / ++	+++	+++	++ / -	+++	++ / -	++	+++	+ / ++
12	Mix de todas las de la tabla 2	- / ++	- / ++	+++	++	+++	+++	+++	- / -	++	+++ medio rosa	+++	++
13	Mix de todas las de la tabla 2	+++	+++	+++	++	+++	++	++	+ / - medio rosa	++	++	+++	+ / ++
14	Mix de todas las de la tabla 2	+ / ++	+++	+ / ++	+ / ++	+++	+++	++	+ / ++ medio rosa	++ / -	+++	+++	+++
15	Mix de todas las de la tabla 2	+ / ++	+++	++ / -	++	+++	+++	++	+++ medio rosa	++	++	+++	++
16	Mix de todas las de la tabla 2	+ / ++	- / +	+++	+++	+++	+++	++	+ / ++ medio rosa	++ / -	++	+++ medio rosa	++
17	Mix de todas las de la tabla 2	+ / ++	+ / ++	++ / -	+++	+++	++	++	+++ medio rosa	++	++	+++ medio rosa	+ / ++
18	Mix de todas las de la tabla 2	+ / ++	+ / ++	+++	+ / ++	+++	+++	+++	+++ medio rosa	+++ fluorescente	++ medio rosa	+++	+ / ++
19	Mix de todas las de la tabla 2	+ / ++	+++	+ / -	++	+++	+++	+++	+++ medio rosa	++	++	+++ medio rosa	+ / ++
20	Mix de todas las de la tabla 2	+++	+++	+ / +	+ / ++	+++	+++	+++	+++ medio rosa	+++	+ / ++	+++	+ / ++
TOTAL FALSOS -		0 de 20 +	0 de 20 +	1 de 20 +	0 de 20 +	3 de 20 +	0 de 20 +	0 de 20 +	0 de 20 +	0 de 20 +			

8. Estudio estadístico de los datos

En toda validación cualitativa partimos de la premisa de eliminar resultados aberrantes o mal expresados (es decir, ilegibles, ambiguos...) antes de realizar ningún cálculo.

Se tendrán en cuenta los siguientes parámetros que miden la calidad del análisis cualitativo:

8.1 Límite de detección es el número de ufc a partir del cual se puede detectar de forma estadísticamente significativa la presencia del microorganismo diana, sin estar sometidos a posibles interferencias ni imprecisiones. Dadas la incertidumbre microbiológica y la distribución "contagiosa" de Poisson de los microorganismos en las muestras (por más que agitemos nunca encontraremos todas las submuestras idénticas, ni en todas ellas tendrá por qué haber presencia de la cepa diana ni siquiera cuando dividiendo el número de ufc inoculadas por los ml afectados, el resultado sea > 1 ufc/g), no podemos atrevernos a certificar (pero sí a afirmar) que el límite de detección es 1 ufc, sino el valor inóculo acompañado de su incertidumbre, siempre que éste haya sido detectado en la mayoría de muestras, como así ha sucedido, por lo que en este caso **el límite de detección demostrado EN CUALQUIER MUESTRA, es de ≥ 1 ufc/ g en todos los parámetros**, ya que no es una cuestión de medios de aislamiento sino de método de estría tras enriquecimiento, el método oficial en la búsqueda de patógenos; y empleamos el mejor caldo de enriquecimiento con neutralización de conservantes demostrado en intercomparación y al tiempo adecuado de 48h.

De modo que cuando en nuestros análisis rutinarios no encontremos ningún patógeno, podríamos sustituir en el informe la ambigua locución "No detectado" o "No encontrado" o la atrevida afirmación "Ausente" por la más correcta expresión de los resultados: ≤ 1 ufc/ g. La pretensión de "ausencia en 1 g" no es estadísticamente demostrable a causa de la incertidumbre microbiológica, ya que por más que mezclemos para homogeneizar, nunca conseguiremos obtener con certeza 1 ufc/g, aunque comercialmente los clientes no entiendan que el límite de detección no es posible demostrar que es 1 ufc/g.

8.2 Sensibilidad: escasez de falsos negativos.

Se tienen en cuenta las tablas 2 y 3 (positivos y positivos mix)

Los medios Biggy, Sabouraud Caf, Baird Parker, MugPlus, MacConkey, CBCSA y Cetrimida no obtienen ningún falso negativo, con las cepas patógenas empleadas, obtienen un 100% de sensibilidad. Aunque recordamos aquí la precaución que se demostró hay que tener en 15 años de intercomparación Seilaparfum: que el Cetrimida es un agar cuyos resultados dependen de la marca comercial, porque los medios Cetrimida de marcas clínicas tienen más proporción de agentes selectivos que la fórmula Farmacopea y proporcionan gran cantidad de resultados falsamente negativos.

El XStaph obtiene 2 falsos negativos de 6 inóculos (33%, es decir, sensibilidad del 67,7%)

El BCPT para Burkholderia obtiene 2 falsos negativos de 6 inóculos (33%, es decir, sensibilidad del 67,7%)

El CUP12A en placa de 90 mm obtiene 1 falso negativo de 20 inóculos positivos (*Candida albicans*), lo cual no sucedió en el estudio previo de diseño del medio. En plaquita hermética de 55 mm también obtiene 1 falso negativo de 20 inóculos positivos (*Candida albicans*), ya que los estafilococos no se

pueden considerar falso negativo en este medio que desde su inicio se invalidó para este microorganismo, que no se busca con él; ni con *B.multivorans*, que ha dado negativo también en los medios para Burkholderia, por lo que no se puede considerar diana. Y en las recién diseñadas DryPlates-CUP12A también obtiene 1 falso negativo de 20 inóculos positivos (*Candida albicans*). De modo que independientemente de su formato, **el CUP12A obtiene un 95% de sensibilidad**, todo un récord teniendo en cuenta que es el único medio para el que hemos considerado positivas prácticamente todas las dianas inoculadas (17 de 20), mientras en medios como el Cetrimida solo se consideran 2 dianas, en el Baird Parker o el XStaph 3 dianas, en el Biggy o el Sabouraud Caf. 1 diana, en el MacConkey o el MugPlus 8 dianas, en el BCPT y el CBCSA 3 dianas... y lógicamente cuantas más dianas consideremos, más aumenta la probabilidad de encontrar falsos negativos.

De hecho, si desde ahora consideramos el CUP12A sólo para los patógenos típicos de cosméticos, excluyendo además de los estafilococos (que ya excluimos durante su diseño), la *Candida albicans* (ambos se deben seguir buscando con los medios de siempre y usar el CUP12A como adicional para los demás patógenos), entonces la sensibilidad se puede considerar del 100% para todo el montón de patógenos que crean retiradas de mercado en cosmética sin contar con *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, que se deben seguir buscando con los otros medios. También hemos aprendido que hay que mejorar el XStaph Agar para que la cepa WDCM 00034 de *Staphylococcus aureus* sea detectable en el mismo, y procedemos a su mejora de inmediato. Y el BCPT para que la cepa DSMZ de *Burkholderia cepacia* sea detectada en él; o bien cambiarlo por el CBCSA que sí detecta las 3 cepas diana de *Burkholderia cepacia* perfectamente. Por cierto, ambos medios para Burkholderia dan falso positivo con ambas dianas de *Pseudomonas aeruginosa*, como saben bien todos los laboratorios que participaban en el inter Seilaparfum, pero esa es una noticia excelente, ya que cuantos más medios detecten patógenos, más difícil será que éstos nos pasen desapercibidos en el análisis.

Si el estudio de sensibilidad de cada medio implicado se hiciera, como en el CUP12A, para todos los patógenos ensayados, la sensibilidad de todos esos medios caería en picado a valores inferiores al 50% en todos los casos (en algunos a menos del 10%), y un 95% de sensibilidad del CUP12A nos parecería impresionante, desde luego lo es, y sería la mayor de todos los medios ensayados (y nos atrevemos a decir que de todos los medios de cultivo que existen).

Internacionalmente se acepta que una Sensibilidad igual o mayor al 95% es suficiente para dar un método o medio como válido, incluso algunos autores aceptan hasta un 90 % de Sensibilidad. Queda claro que el CUP12A supera la prueba con excelencia y es el medio indicado para buscar todos los patógenos evaluados que han provocado retiradas de mercado, excepto *St.aureus* y *C.albicans* que deben seguir siendo analizados con los medios habituales.

La sensibilidad es el parámetro más importante de una validación cuantitativa, porque mide qué proporción de muestras se nos pueden escapar como falsamente negativas.

En la tabla de patógenos MIX los resultados concuerdan bastante con los obtenidos en la tabla de patógenos sueltos (1 falso negativo de XStaph Agar y 3 falsos negativos de BCPT Agar, pero ningún falso negativo de CUP12A), aunque esta situación sea menos coherente con la realidad ya que las contaminaciones de cosméticos son puntuales y no suelen ser mixtas. Pero intuimos que esta parte del estudio nos serviría para obtener otro tipo de conclusiones, como así ha sido y veremos en el capítulo de

conclusiones. Sólo añadir que no se obtienen ni un solo falso negativo en ninguno de los 3 formatos de CUP12A cuando hay un MIX de dianas, por lo que la sensibilidad volvería a ser del 100% bajo estas premisas.

8.3 Especificidad: escasez de falsos positivos.

En el estudio de falsos positivos (especificidad), para cada medio selectivo, hemos de tener en cuenta no sólo los inóculos de cepas inocuas, sino además (y sobre todo) los de cepas patógenas que no son la diana de cada medio empleado.

De la tabla de negativos inocuos, como sólo teníamos 6 microorganismos inocuos capaces de crecer en los medios empleados, hubo que repetir cada uno de ellos en 3 muestras diferentes (y 2 de ellos en 4 muestras).

En esta parte del estudio se obtienen 0 falsos positivos inocuos en Biggy (100% de especificidad), frente a 16 falsos positivos inocuos de 40 estrías negativas en Sabouraud Caf (todo un desmorone para un medio que según Norma ISO puede sustituir al manífico Biggy, quedando claro que no es así, con una especificidad de sólo el 60% con las cepas empleadas).

Se obtienen 13 falsos positivos inocuos en XStaph Agar de 40 estrías negativas (67,5% de especificidad), frente a 11 falsos positivos inocuos en Baird Parker de 40 estrías negativas (72,5% de especificidad).

Se recuperan 0 falsos positivos inocuos en MugPlus (100% de especificidad), frente a 11 falsos positivos inocuos de 40 estrías negativas en MacConkey Agar (72,5% de especificidad).

Obtenemos 1 falso positivo inocuo de 40 estrías negativas en BCPT (97,85% de especificidad), frente a 14 falsos positivos inocuos de 40 estrías negativas en CBCSA (65% de especificidad).

Se obtienen 0 falsos positivos inocuos en Cetrimida (100% de especificidad).

Y por fin, se obtienen 7 falsos positivos inocuos de 40 estrías negativas en CUP12A en placas de 90 mm (82,5% de especificidad), 6 falsos positivos inocuos de 40 estrías negativas en CUP12A en plaquis de 55 mm (85% de especificidad) y 7 falsos positivos inocuos de 40 estrías negativas en DryPlates-CUP12A (82,5% de especificidad), con una **especificidad media del CUP12A del 83,33%** cuando no hay presentes patógenos pero sí hay microorganismos inocuos.

Si el estudio de especificidad de otros medios se hiciese, como en el CUP12A, para todos los patógenos e inocuos ensayados, la especificidad de todos esos medios sería inferior al 50% en todos los casos (en algunos menor del 10%), y un 83,33% de especificidad del CUP12A nos parecería impresionante, desde luego lo es, y sería la mayor de todos esos medios (y nos atrevemos a decir que de todos los medios de cultivo que puedan existir para abarcar el mayor número posible de patógenos implicados en retiradas de mercado de cosméticos).

En cuanto a la tabla de positivos concretos (patógenos que han provocado retiradas de mercado de cosméticos), obtenemos 0 falsos positivos de 38 estrías positivas que no contenían la diana de este medio en Biggy (100% de especificidad), frente a 7 falsos positivos de 38 estrías positivas que no contenían la diana de este medio en Sabouraud Caf, lo cual descoloca la fama del cloranfenicol de inhibir el crecimiento bacteriano, ya que todos estos falsos positivos son bacterias patógenas (81,58% de especificidad).

Se obtienen 9 falsos positivos de 28 estrías positivas que no contenían la diana de este medio en XStaph (67,86% de especificidad), frente a 17 falsos positivos de 28 estrías positivas que no contenían la diana de este medio en Baird Parker (pésima especificidad del 39,29%).

Se obtienen 0 falsos positivos de 24 estrías positivas que no contenían la diana de este medio en MugPlus (100 % de especificidad), frente a 14 falsos positivos de 24 estrías positivas que no contenían la diana de este medio en MacConkey Agar (pésima especificidad del 41,67 %).

Se obtienen 16 falsos positivos de 34 estrías positivas que no contenían la diana de este medio en BCPT (52,94 % de especificidad), frente a 17 falsos positivos de 34 estrías positivas que no contenían la diana de este medio en CBCSA (similar especificidad frente al BCPT, del 50% en CBCSA).

Se obtienen 0 falsos positivos de 36 estrías positivas que no contenían la diana de este medio en Cetrimida (100 % de especificidad).

No se pueden estudiar los falsos positivos en CUP12A a partir de siembras de positivos, por muy diversos que éstos hayan sido, ya que no es posible en tal caso obtener falsos positivos en un medio que ha sido diseñado para todos ellos (29 cepas diana en 20 muestras diferentes).

Internacionalmente se acepta que una Especificidad igual o mayor al 95% es suficiente para dar un método o medio como válido en este parámetro, incluso algunos autores aceptan hasta un 90 % de Especificidad. Por tanto, el CUP12 Agar está cerca de cumplir la escasez de falsos positivos en este estudio con cepas; pero lo importante es que no hay medio en el mercado que se acerque tanto a ese 95% de especificidad y además, que lo cumple con creces en el estudio con muestras naturales (ver capítulo 9).

La **eficacia relativa** no es más que la media entre la sensibilidad y la especificidad; en este caso la eficacia relativa para el CUP12A, es la media del 95% de sensibilidad y del 83,33 % de especificidad, es decir, el 89,165%: casi 9 de cada 10 muestras son correctamente asignadas, lo que permite un correcto barrido, sobre todo si se acompaña de los medios para los patógenos en los que este medio no es suficiente (*Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*)

Los **resultados discordantes** son el número de resultados que no han salido como debían haber salido de acuerdo con los valores inóculo, es decir, la suma de falsos positivos (20 de 60 inóculos y 0 de 60 patógenos) y de falsos negativos (4 de 60); total 24 de 180, un 13,33%. También se puede asimilar a: “100%-eficacia relativa%”, es decir, un 10,835 %. Valor fantástico en microbiología, donde se debe esperar casi siempre cerca del 10 % de resultados discordantes.

8.4 Conformidad y Concordancia: medidas de Precisión en validaciones cualitativas. La conformidad viene a ser el homólogo de la repetitividad de las validaciones cuantitativas y la concordancia viene a ser el homólogo de la reproducibilidad de las validaciones cuantitativas. De modo que para calcular la Conformidad se comparan los dos resultados de cada uno de los pares de muestras del mismo día y operario; y para calcular la Concordancia se comparan los resultados obtenidos para cada pareja de muestras idénticas, entre cada uno de los dos días y/o entre cada uno de los dos operarios. El parámetro “Oportunidad relativa de concordancia” OPC sirve para comparar la Conformidad con la Concordancia (es el cociente Conformidad/Concordancia) de modo que permite detectar si dos resultados tienen más

probabilidad de salir idénticos en un mismo día y operario (OPC >1) o entre diferentes días u operarios (OPC <1).

Aunque no hemos realizado duplicados de placas para calcular la conformidad con el analista y en el día en que hemos realizado la validación, ni repeticiones por distintos analistas (también valdría en diferentes días por el mismo analista) para calcular la concordancia (ya que no son parámetro exigidos), ya que se demuestra en anteriores validaciones que da demasiado trabajo para la escasa información que aporta, sí se pueden considerar duplicadas todas las muestras: todas las de la dilución [-1] comparadas con todas las de la dilución [-2]. De modo que cada valor que no salga idéntico para cada par de muestras idénticas, debería considerarse una inconformidad o una incorcordancia (según se comparasen duplicados del mismo día y operario o bien duplicados de diferentes días o diferentes operarios).

31 resultados opuestos de 240 resultados totales a diferente dilución en la tabla de negativos

26 resultados opuestos de 240 resultados totales a diferente dilución en la tabla de positivos

21 resultados opuestos de 240 resultados totales a diferente dilución en la tabla de mix de positivos

De este modo, el estudio de conformidad/concordancia arrojaría un 10,83% de resultados en los que no concuerdan los crecimientos entre ambas diluciones, equiparable a un CV% de imprecisión de tan solo ese 10,83%, cuando las entidades de acreditación aceptan hasta un 25% de imprecisión como razonable en la mayoría de casos en microbiología.

Robustez del parámetro ensayado: Denominamos así la capacidad del parámetro "*Patógenos implicados en retiradas de mercado de cosméticos*" para optimizar la equivalencia de resultados entre los diferentes métodos/medios ensayados; de modo que cuanto más cercanos sean los resultados en los diferentes métodos, más robusto se considerará el parámetro. No hay que confundir esta robustez con la robustez de cada método de ensayo de un parámetro concreto, que viene en parte definida por los anteriores parámetros. Al ser los resultados obtenidos muy similares entre lo obtenido en CUP12A (sin tener en cuenta *Staphylococcus aureus* ni *Candida albicans*, para los que ha quedado invalidado en este estudio) y lo obtenido en la suma de los demás medios, concluimos que la robustez de este parámetro es muy elevada.

Y lo que es más importante, en CUP12A sí que se encuentran todos los demás patógenos que no se están buscando en los laboratorios y sin embargo ya han provocado retiradas de mercado de cosméticos.

9. Validación con muestras naturales durante 9 meses de análisis (Febrero a Octubre de 2022)

Muestras KosmLab en paralelo desde 8/2/2022 hasta 31/X/2022 (indicamos sólo las muestras donde hemos encontrado positivos con algún medio y las **discrepancias entre CUP12A y los demás medios**):

	Medios habituales (7 sin contar los de <i>S.aureus</i>)	CUP12A
2674	Todos - y así las demás muestras, no indicadas para que la tabla no sea enorme	- y así los demás no indicados
2675	+ M+, XLD, CHR Salm, <i>K.ozanae</i>	+
2684	+ XStaph verdes	+ (falso + de Staph coag -)
2688	Todos - y 30 aerobios/g	+ (no sabemos que aerobios eran)
2692	+ Cetrimida ox-	+
2702	+ XStaph verdes coag +	+
2703	Todos -	+Gram+ coag- cat+ ox- <i>St.hominis ssp novobiosepticus</i> en gel (Patógeno Gr2)
2713	Todos -	+ <i>B.cereus</i> en toallitas (Patógeno Gr.2)
2733 a 2752	+ BCPT, XStaph, Biggy y MugPlus en 20 muestras inter	+ en las mismas (x 20 y x 4)
2757	+ Cetr ox-	+
2763	+ XStaph y BP aunque coag -	+
2764	+ BP aunque coag -	+
	+ <i>B.cepacia</i> DSMZ, - 48h en BCPT y en CBCSA	+ correcto
2766 y 2767	XStaph+ y BP+	-, ya sabemos que es el único patógeno cosmético para el que no sirve el CUP12A
2768	MugPlus blancas	+ (falso en ambos medios pero el MugPlus lo descarta desde ya)
2769	Cetr +, ox +	+
2782	XStaph – (falso negativo)	+, Neogram +, Cat +, Coag +
2787	EPA + Cat – (Enterococo fecal)	- gel aloe
2782 a 2787	Idoneidad todo +	Idoneidad +
2795	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> M+	+ (Grupo 2) en toallitas
2808	Cromosalm verde, <i>Ps.oryzihabitans</i> (gr 2)	+
2810	Cetr +, ox -	+, ox -
2811	Rosas en MugPlus: coliforme	+
2813	M+ hialinas, Cromosalm verde, ox-	+ (ID molecular)
2818	Blancas en XLD	+ en toallitas
2831	Blancas en XLD	+ en toallitas
2832	Blancas en XLD, verdes en cromosalm	+ en toallitas
2842	Grisas con halo en BP, coag-	+
2843	Grisas con halo en BP, coag-	+
2845	Todos -	+ <i>St.haemolyticus</i> gr2, en toallitas (Patógeno Gr.2)
2847	Típicas en BP y verdes en XStaph pero coag-	+
2848	Típicas en BP pero coag-	+
2849	Típicas en BP pero coag-	+ <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Inocuo Gr.1)
2852	<i>Ps.aeruginosa</i> , <i>St.aureus</i> , <i>C.albicans</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	+ crema antiarrugas inter2 (x4)
2853	<i>Ps.aeruginosa</i> , <i>St.aureus</i> , <i>C.albicans</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	+ crema antiarrugas inter2 (x4)
2856	<i>Ps.aeruginosa</i> , <i>St.aureus</i> , <i>C.albicans</i> , <i>E.coli</i>	+ Aceite corporal inter (x4)
2861 a 2879	<i>Ps.aeruginosa</i> , <i>St.aureus</i> , <i>C.albicans</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	+ crema antiarrugas inter2 (x 20 y x 4)

Las validaciones con muestras naturales se consideran más decisivas que las validaciones con cepas inoculadas. Su problema es que suele haber pocos positivos reales, y todavía menos de aquellos patógenos concretos que se buscan en cosméticos, por lo que pueden demorarse durante años. En este caso hay muchos positivos reales a causa de la inclusión de muestras de idoneidad y de las 3 rondas de intercomparativos con inóculos desconocidos en que participamos en este periodo, en dos de las cuales estudiamos además la homogeneidad y la estabilidad del inóculo.

CUP12A: De 205 muestras naturales, el CUP12A comete **1 solo falso negativo** por enterococos fecales (**99,5% sensibilidad**), falso negativo que también habría cometido cualquier laboratorio (ya que casi nadie lo busca), de modo que podría considerarse un 100% si nos comparamos con la situación actual. Y **1 solo falso positivo** por un Bacilo inocuo: *Bacillus amyloliquefaciens* (**99,5% especificidad**). Además detecta 3 patógenos del Grupo 2 que ningún otro medio de los 7 empleados detecta (*Staphylococcus hominis ssp novobiosepticus*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus haemolyticus*), por lo que **mejora al menos un 1,5% la sensibilidad de la suma de todos los demás medios juntos**.

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

A) El CUP12A en muestras inoculadas con cepas inocuas y patógenas demuestra ser el medio ideal para añadir al Biggy y al Baird Parker en la búsqueda de TODOS los patógenos que provocan retiradas de mercado de cosméticos. Con un **95% de sensibilidad** (escasez de falsos negativos: sólo 1 de cada 20 muestras positivas es dada como negativa) rebosa las expectativas de cualquier otro medio de cultivo en la búsqueda de todos los patógenos cosméticos. Y con un **83,33% de especificidad** (escasez de falsos positivos: aprox 1 de cada 10 muestras negativas es dada como positiva) ahorra ingentes cantidades de trabajo con respecto a medios generales como sería el uso de TSA por estría tras enriquecimiento (según ISO 18415: 2012 de microorganismos específicos y no específicos), que en esta validación, con las cepas inocuas que hemos empleado, hubiera dado un 0% de especificidad y nos hubiera hecho perder el tiempo identificando el 100% de colonias inocuas.

Los medios que más nos hacen perder el tiempo en confirmaciones para que luego las colonias crecidas no sean las diana, son, por orden descendiente de este defecto:

-1º Baird Parker, 39,29% de especificidad con 17 falsos positivos de 28 patógenos que no eran su diana (y 72,5% de especificidad con 11 falsos positivos de 40 inocuos)

-2º MacConkey Agar, 41,67% de especificidad con 17 falsos positivos de 24 patógenos que no eran su diana (y 72,5% de especificidad con 11 falsos positivos de 40 inocuos)

-3º CBCSA, 50% de especificidad con 17 falsos positivos de 34 patógenos que no eran su diana (y 65% de especificidad con 14 falsos positivos de 40 inocuos)

-4º BCPT Agar, 52,94% de especificidad con 16 falsos positivos de 34 patógenos que no eran su diana (y 97,85% de especificidad con 1 falso positivo de 40 inocuos)

-5º XStaph Agar, 67,86% de especificidad con 17 falsos positivos de 28 patógenos que no eran su diana (y 67,5% de especificidad con 13 falsos positivos de 40 inocuos)

-6º Sabouraud Caf Agar, contra todo pronóstico, no sólo crecen las levaduras interferentes de *Candida albicans*, sino además varias bacterias resistentes al cloranfenicol, con aspecto de levadura; 81,58 % de especificidad con 7 falsos positivos de 38 patógenos que no eran su diana (y 60% de especificidad, con 16 falsos positivos de 40 inocuos)

-7º **CUP12A**, 83,33% de especificidad con 7 falsos positivos de 40 inocuos; **queda en un honroso segundo puesto en especificidad**, más logro al tener 29 dianas frente a 1-8 dianas de los demás

-8º Biggy, MugPlus y Cetrimida obtienen los 3 un 100% de especificidad, tanto con inocuos como con patógenos que no son sus respectivas dianas

Los medios con resultados falsamente negativos de sus diana son el XStaph Agar con un 67,7% de sensibilidad con respecto a las 3 cepas diana empleadas y el BCPT con el mismo 67,7% de sensibilidad con respecto a las 3 cepas diana empleadas. Los demás medios empleados obtienen un 100% de sensibilidad con las dianas empleadas para cada uno de ellos (Biggy con 1 sola diana, Sabouraud Caf con 1 sola diana, Baird Parker con 3 dianas, MugPlus con 8 dianas, Mac Conkey con 8 dianas, CBCSA con 3 dianas, y Cetrimida con 2 dianas. Lógicamente el CUP12A despunta al haber sido testado frente a nada menos que 29 cepas diana, obteniendo un 95% de sensibilidad ante todas ellas. Si eliminamos *Candida albicans*, como lo hicimos en su día con *St.aureus*, (en este acto actualizamos su folleto para la exclusión de *C.albicans*) **la sensibilidad del CUP12A sube al 99%**, al fallar solo ante *Burkholderia multivorans* y sólo en su formato de plaquita hermética (ante esta cepa también han fallado los dos medios de Burkholderia: BCPT y CBCSA, por lo que **esto elevaría la sensibilidad del CUP12A al 100%**).

Estudiando estos 1.440 datos comparados, podemos extraer otras conclusiones muy interesantes, no sólo respondiendo al motivo de la validación sobre la idoneidad del medio CUP12A en comparación con los otros 9 medios. Y seguramente el lector pueda extraer otras conclusiones interesantes:

✓ El mejor crecimiento de una cepa a la [-1] o a la [-2] es impredecible: no hemos encontrado correlación que nos permita presuponer que una cepa concreta va a crecer mejor a una concentración o a la otra. Lo que sí hemos detectado es que cada cepa, a veces crece bien a una concentración pero no crece en absoluto a la otra, y viceversa. → Se concluye que estriando una sola concentración como hace el protocolo más seguido en cosméticos, se pueden obtener resultados falsamente negativos, por lo que **aconsejamos la estría de ambas diluciones en todo análisis cosmético** (método Seilaparfum)

✓ A la vista de la similitud de resultados entre la tabla 2 (patógenos sueltos) y la tabla 3 (mezcla de todos los patógenos juntos) se concluye que **no hay antagonismo entre las cepas patógenas elegidas**

✓ En las validaciones es muy importante emplear **varias cepas diferentes de cada diana** para poder llegar a conclusiones certeras, ya que no todas se comportan igual en los medios de cultivo; si por ejemplo, sólo hubiéramos empleado la cepa de *St.aureus* WDCM00034, hubiera parecido que el XStaph Agar es un desastre, pero si sólo hubiéramos empleado la cepa de *St.aureus* WDCM00032 o la cepa de *St.aureus* WDCM00131, hubiera parecido que el XStaph Agar es fantástico. Y ninguna de las dos afirmaciones es cierta. → La verdad es que XStaph Agar simplemente funciona mejor que el Baird Parker en especificidad, pero peor en sensibilidad, por lo que vamos a mejorarlo. Así han ido naciendo nuestros medios más modernos, cuando no encontrábamos en intercomparación ningún medio satisfactorio.

Como consecuencia de todos estos resultados estadísticos, se demuestra que el método de enriquecimiento de 1 g de muestra en 9 ml de LPT Neutralizing Broth de MICROKIT, seguido de su incubación de 48 h a $32,5 \pm 2,5$ °C, y seguido de la estría en los agares adecuados, es el método idóneo para la detección de "*Patógenos implicados en retiradas de mercado de cosméticos*" en 1 g de muestra de los cosméticos que analizamos.

B) El CUP12A en muestras naturales, de acuerdo con el capítulo 9 de esta validación, estudio tan necesario para evitar el sesgo que provoca la elección de cepas en los estudios de validación con inóculos artificiales, los resultados son aun mucho mejores para el CUP12A:

De 205 muestras naturales, el CUP12A sufre **1 solo falso negativo** por enterococos fecales (**99,5% sensibilidad**), falso negativo que también habría ocurrido en cualquier otro laboratorio con los medfios que se emplean en cosmética, de modo que podría considerarse un 100% si nos comparamos con la situación actual. Aún así el estándar oficial de sensibilidad del 95% queda ampliamente superado.

Y **1 solo falso positivo** por un Bacilo inocuo: *Bacillus amyloliquefaciens* (**99,5% especificidad**), por lo que también el estándar oficial de especificidad del 95% queda ampliamente superado.

Además el CUP12A detecta 3 patógenos del Grupo 2 que ningún otro medio de los 7 empleados detecta (*Staphylococcus hominis ssp novobiosepticus*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus haemolyticus*), por lo que **mejora al menos en un 1,5% más la sensibilidad de la suma de todos los demás medios juntos**.

Por todo ello, se considera validado con excelencia el CUP12A en muestras cosméticas con el protocolo seguido en esta validación.

Se complementa y se mantiene la presente validación mediante la participación en varios ejercicios de **Intercomparación** con otros laboratorios a lo largo del año, para matrices cosméticas (con conservantes).

Y se seguiremos comparando muestras naturales para obtener más datos, incluidos los que quieran aportar los laboratorios que empiecen a usar este medio CUP12A como complemento para cumplir con la legislación (= inocuidad microbiológica demostrada en cada lote del cosmético).

11. Bibliografía

- + Guía para la validación de ensayos microbiológicos y ejemplos de protocolos. MICROKIT, 2006.
- + Real Farmacopea Española, 3ª edición.
- + Ministerio de Sanidad y Consumo. “Manual” para el Control Microbiológico de Productos Cosméticos. 1994.
- + Validación de análisis microbiológicos de cosméticos. 11 pp. MICROKIT © 09-Julio-2009.
- + UNE EN-ISO 22718:2010 Detección de *Staphylococcus aureus* en muestras cosméticas.
- + UNE EN-ISO 18416:2010 Detección de *Candida albicans* en muestras cosméticas.
- + UNE EN-ISO 22717:2010 Detección de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras cosméticas.
- + UNE EN-ISO 21150:2010 Detección de *Escherichia coli* en muestras cosméticas.
- + UNE EN-ISO 18415: 2012 Detección de Especificados y no especificados en muestras cosméticas.
- + Laboratorios MICROKIT, S.L. “Manual de medios de cultivo y kits”. 2005.
- + La mejora de la calidad analítica mediante ensayos intercomparativos. Sanchis, J. Laboratorios MICROKIT, S.L. y otros autores. Congreso microbiología Cáceres. Septiembre 2005. Técnicas de Laboratorio, Noviembre 2005.
- + Informes Seilaparfum de MICROKIT desde 2005 hasta 2021

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



Jorge Sanchis Solera
Director Técnico y de I+D, Lab. MICROKIT, S.L.
Analista responsable, KosmLab, S.L.

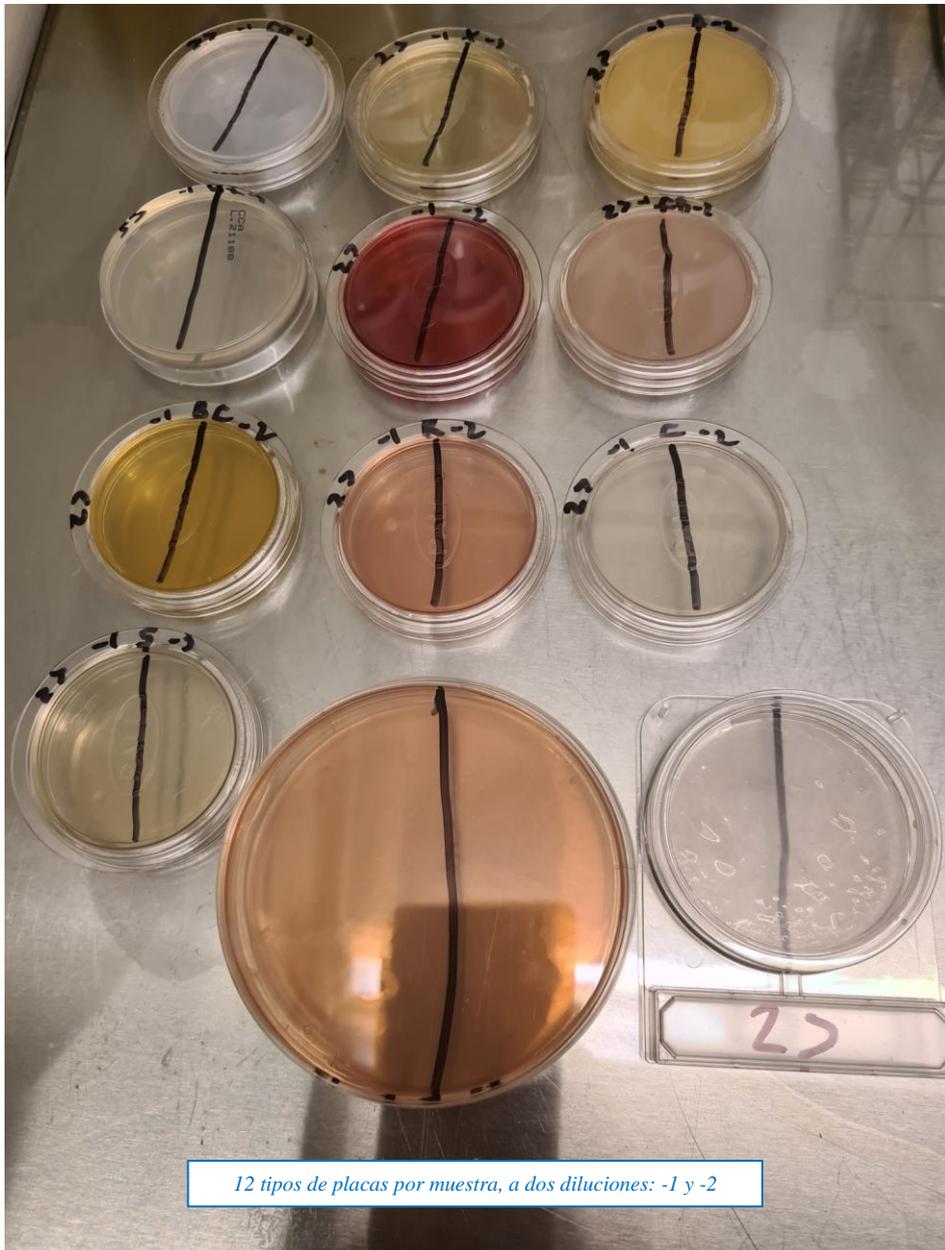
Medios empleados fabricados por: Miriam Ibáñez López y Eva Mª Sánchez Pozuelo, Lab.Microkit
Cepas empleadas fabricadas por: Jorge Sanchis Solera y Eva Mª Sánchez Pozuelo, Lab.Microkit

Valdemorillo, 09 de Noviembre de 2022

ANEXO 1

Fotografías de la validación







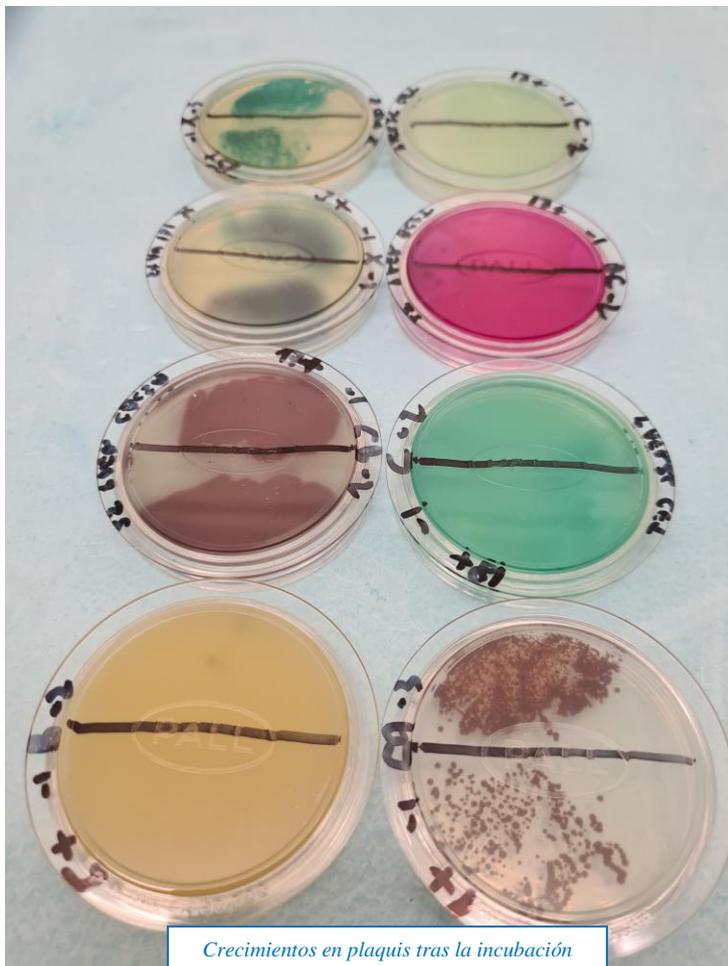
20 x 3 Muestras a dilución (-1) en bote y a (-2) en tubo



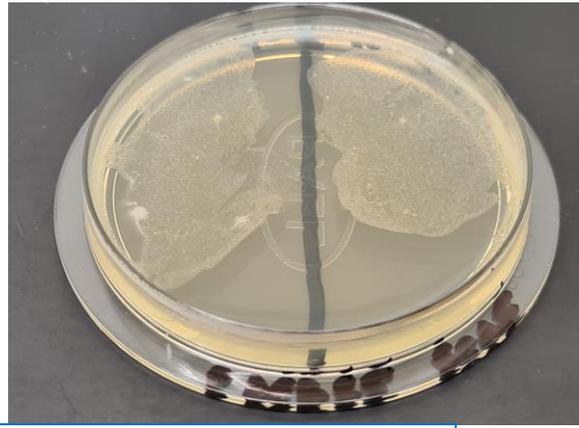
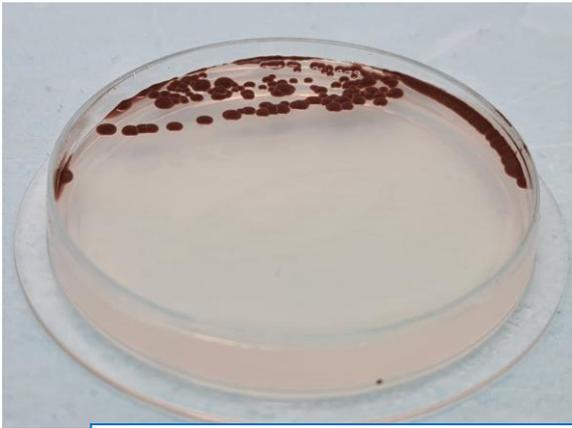
Sembrando ambas diluciones en las 12 placas



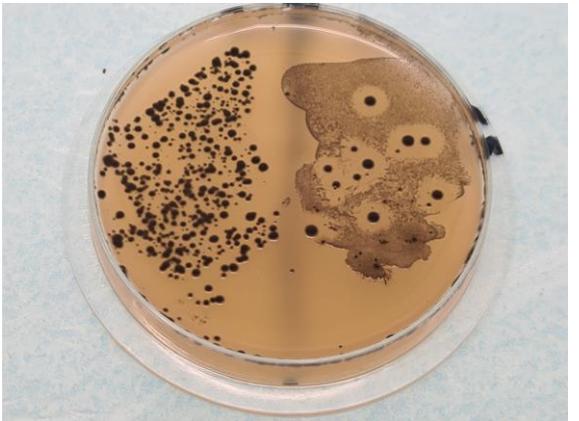
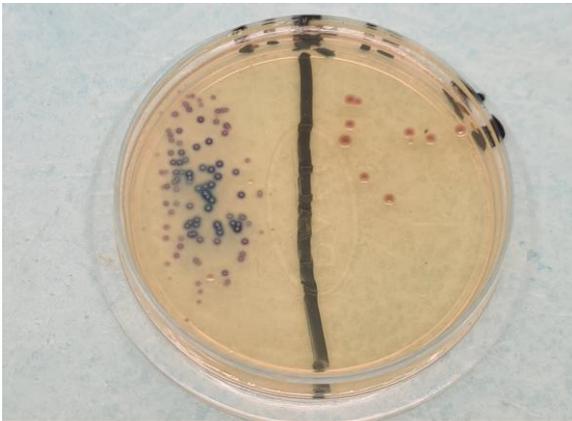
Incubación de las 60 pilas de plaquis



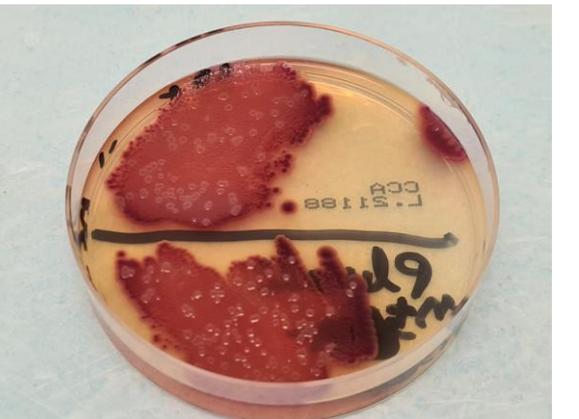
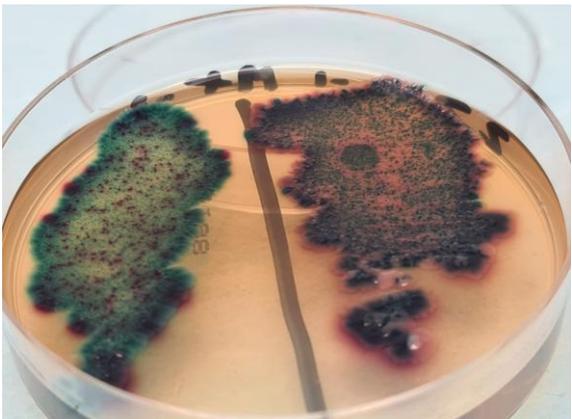
Crecimientos en plaquis tras la incubación



Izda: *Candida albicans* en Biggy. Dcha: Falso positivo de *Pseudomonas aeruginosa* en Sabouraud Caf



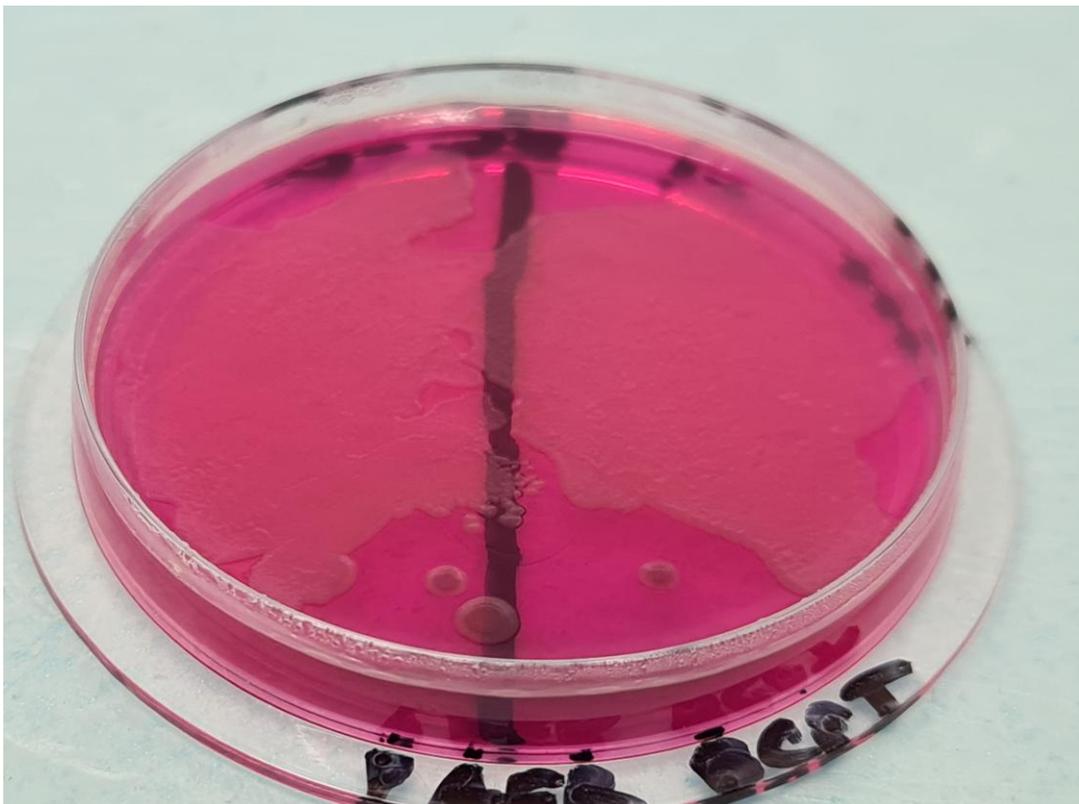
Izda: XStaph Agar con 3 morfologías coloniales, las 2 de la izda sospechosas (azul y violeta). Dcha: Baird Parker con falso positivo de *Pseudomonas putida* con aspecto de *St. aureus* (y fenómeno de autoinhibición de colonias primarias dentro de una masa de colonias secundarias)

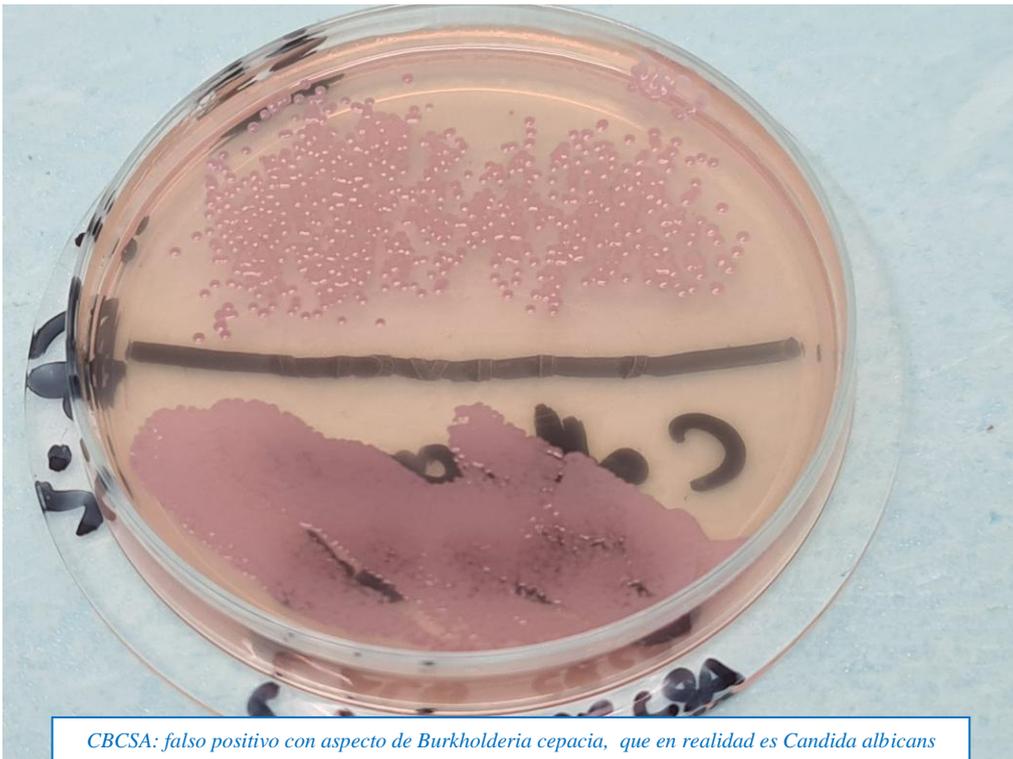


MugPlus (CCA). Izda: 3 morfologías coloniales en la masa de crecimiento de la estría (verdes de *Shigella flexneri*, azules de *E. coli* y rosas de *Klebsiella pneumoniae*). Dcha: El frecuente generador de retiradas de mercado *Pluralibacter gergoviae* crece fucsia en MugPlus

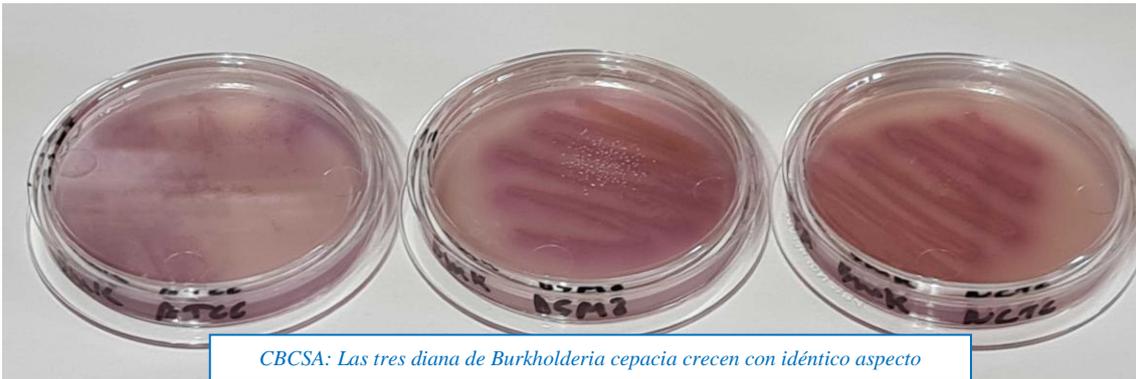


Arriba: MacConkey Agar: falso positivo con aspecto de coliforme, que en realidad es el inocuo *Staphylococcus saprophyticus* Abajo: BCPT Agar: falso positivo con aspecto de *Burkholderia cepacia*, que en realidad es *Pseudomonas aeruginosa*





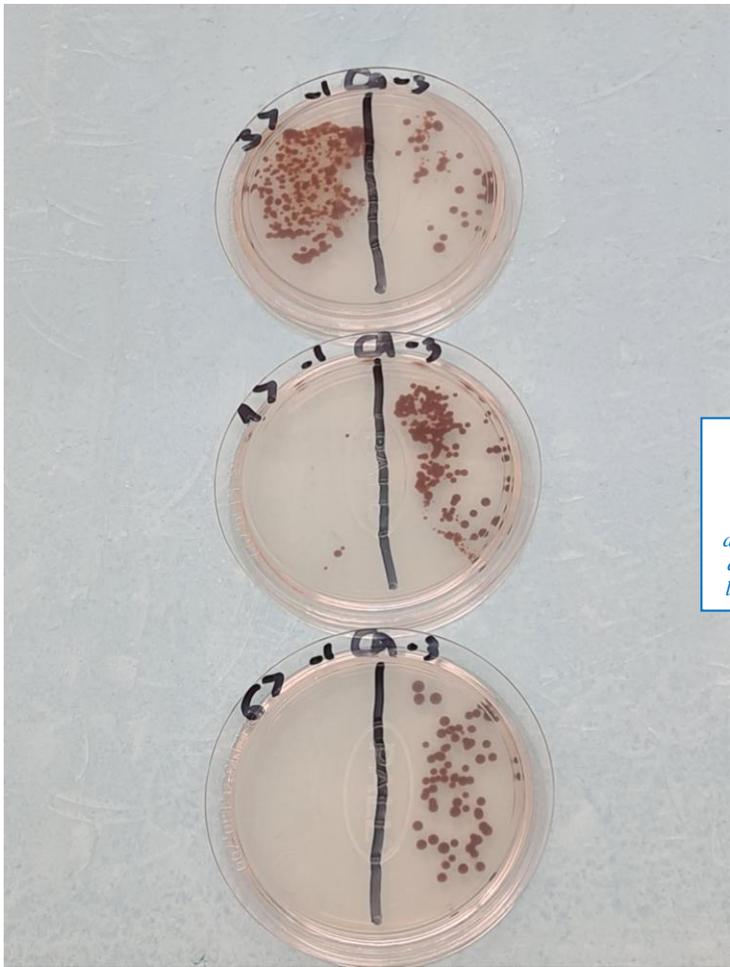
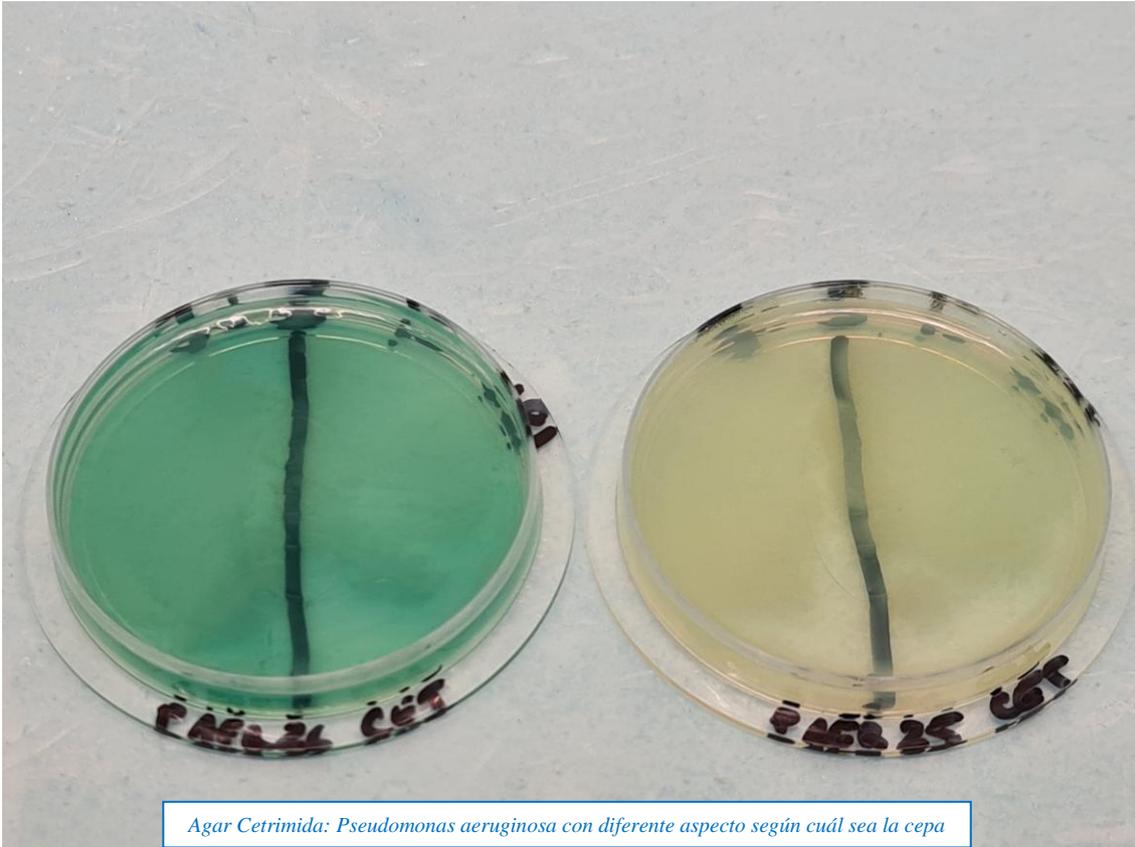
CBCSA: falso positivo con aspecto de *Burkholderia cepacia*, que en realidad es *Candida albicans*

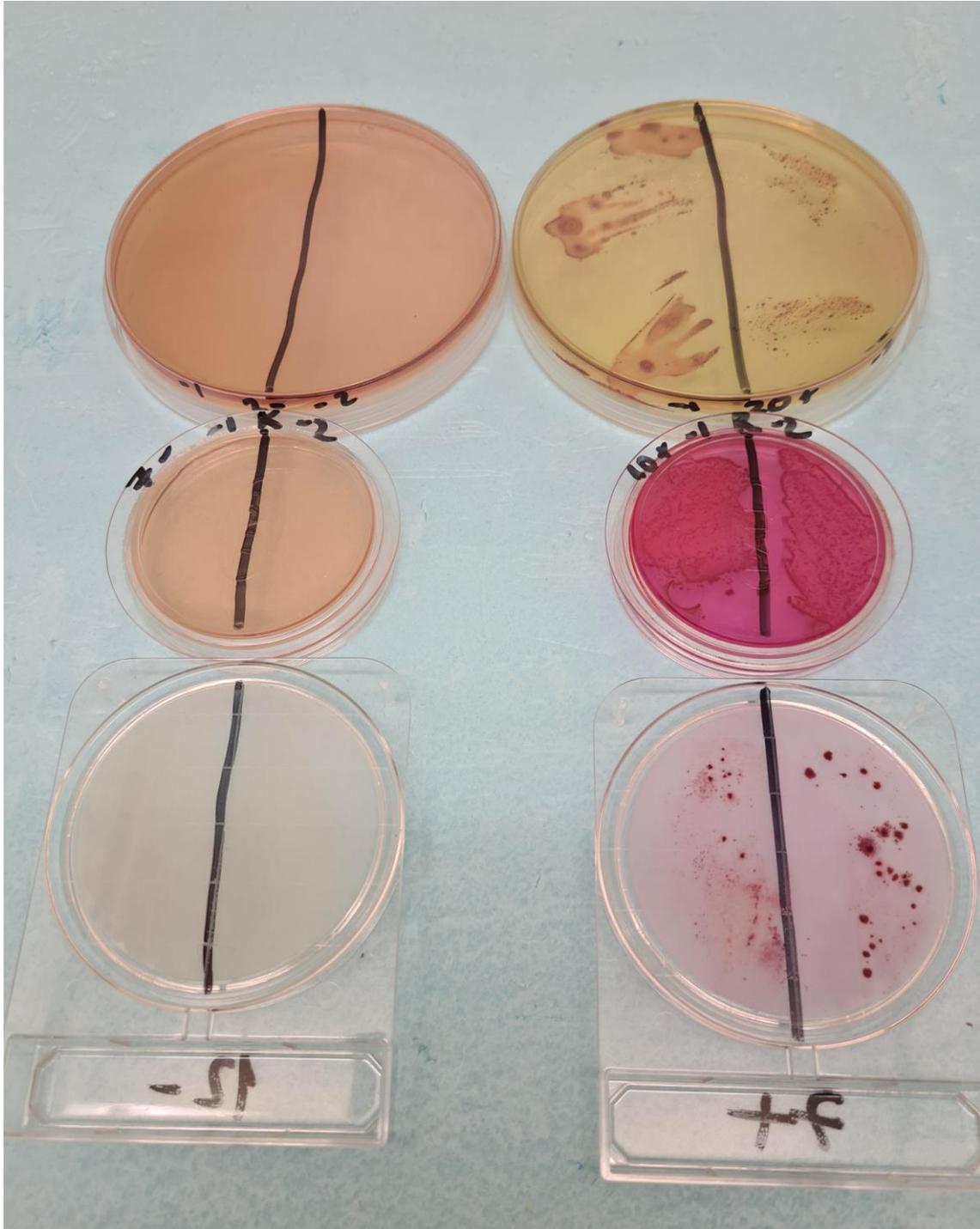


CBCSA: Las tres diana de *Burkholderia cepacia* crecen con idéntico aspecto

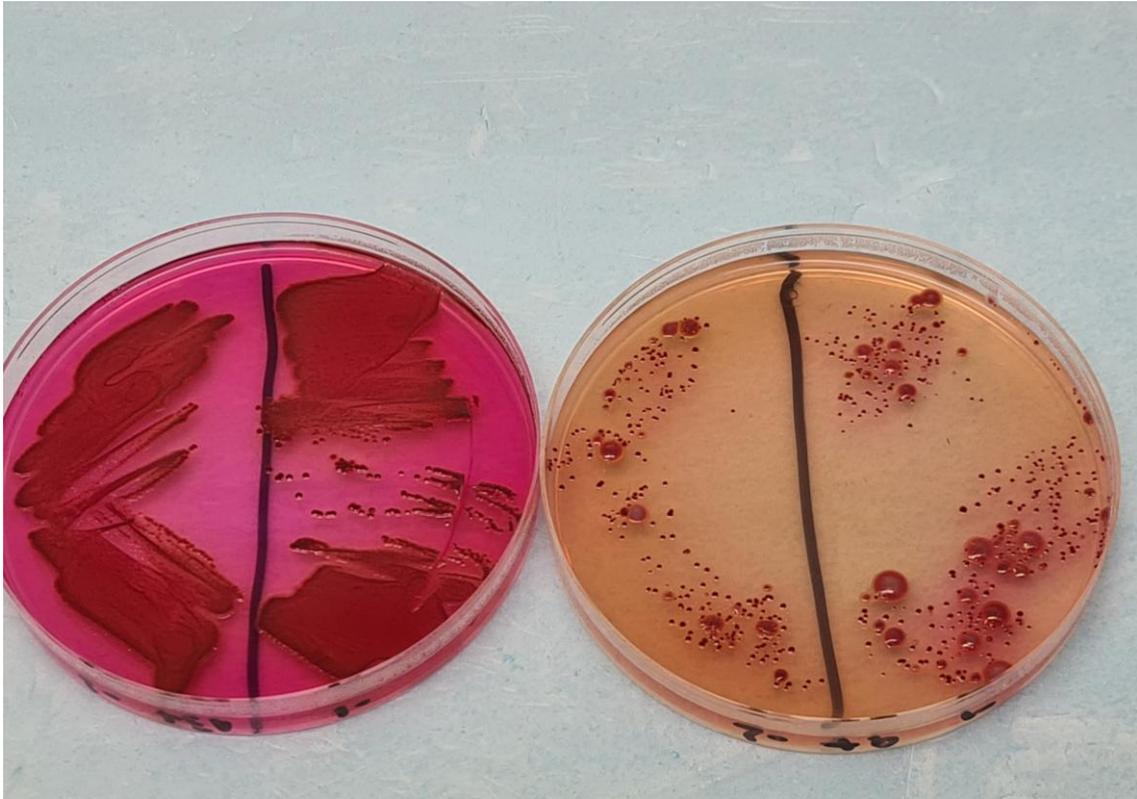


Agar Cefrimida: *Klebsiella pneumoniae* crece como falso positivo

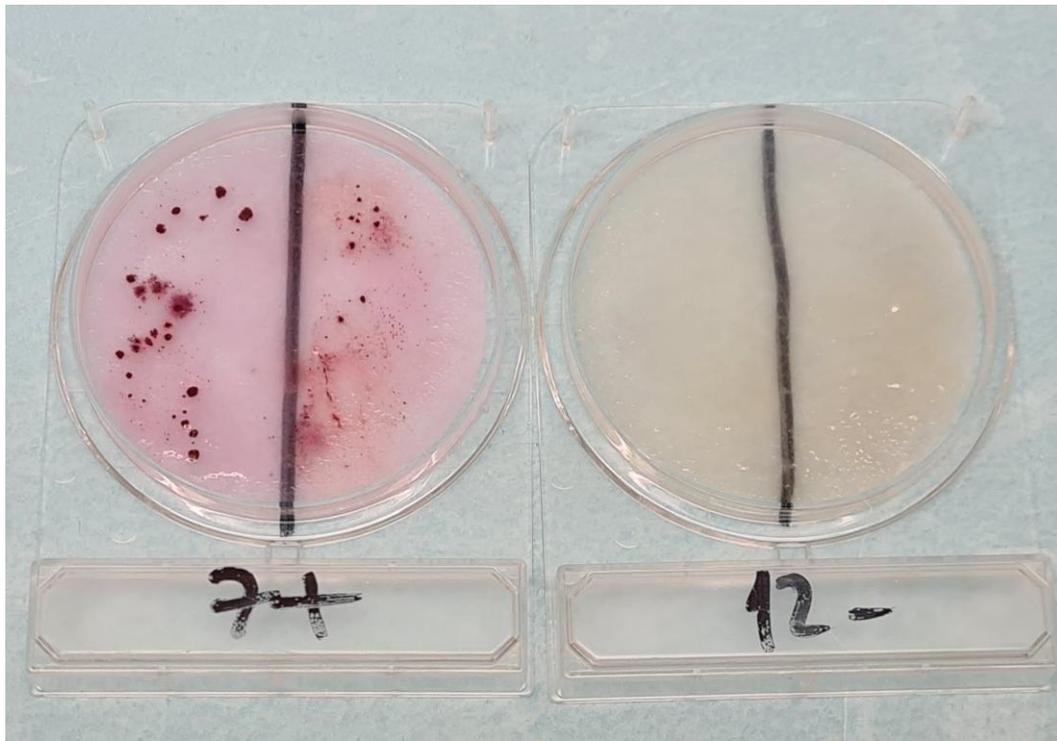




*CUP12A. Izda negativos para patógenos cosméticos, Dcha positivos para patógenos cosméticos.
De arriba abajo, en formato placa de 90, plaqui® hermética y DryPlates®*



CUP12A. Positivos muy abundantes (hasta viran de color el medio a fucsia) y menos abundantes de patógenos cosméticos



CUP12A en formato DryPlates®. Positivos de patógenos cosméticos, en la placa izda (y medio virado a rosa) y negativos en la placa Dcha