

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, Biólogo Director Técnico; María Morales San José, Bióloga Responsable de Control de Calidad; Sylvia Ajates Rodríguez, Química Responsable de Informática. Laboratorios Microkit, S.L.

1. Objetivo

Validar el método y los kits P/A de Microkit para sus microorganismos diana, con toda clase de flora interferente, basando el estudio en los resultados obtenidos en los servicios intercomparativos de análisis de aguas Seilagua®, con respecto al método MF. Se han manejado las hojas de cálculo para validaciones, según la empresa especialista GSC.

2. Kits P/A (y método Microkit) a validar

1. P/A *Pseudomonas aeruginosa* + *Burkholderia cepacia* (RPL302) Cromogénico.
2. P/A *Legionella pneumophila* (RPL330) turbidez/floculación y como revitalizante.
3. P/A *Staphylococcus aureus* (RPL320) Cromogénico.
4. Enterocult (Enterococos fecales) (RPL301) Cromogénico.
5. Clostricult-2 (*Cl.perfringens* y sus esporas) (RPL308) Cromogénico.
6. MCC Colicult (Coliformes y *E.coli*) (RPL303) Cromo-fluorogénico.

3. Datos

Proceden de los resultados del servicio intercomparativo Seilagua®, cuyos datos son públicos aunque los participantes

son confidenciales. Se comparan los resultados de los participantes que indican utilizar los Kits de P/A de Microkit frente a los que indican el uso de filtración de membrana.

El presente estudio se basa en los siguientes servicios intercomparativos Seilagua:

- Enero de 2003 (39 laboratorios participantes)
- Abril de 2003 (44 laboratorios participantes)
- Julio de 2003 (20 laboratorios participantes)
- Octubre de 2003 (46 laboratorios participantes)
- Enero de 2004 (28 laboratorios participantes)
- Abril de 2004 (31 laboratorios participantes)
- Julio de 2004 (23 laboratorios participantes)
- Octubre de 2004 (25 laboratorios participantes)
- Enero de 2005 (20 laboratorios participantes)
- Abril de 2005 (18 laboratorios participantes)
- Julio de 2005 (17 laboratorios participantes)

Total: 311 datos (47 de ellos son de P/A, los restantes 264 de MF)

4. Criterios de validación

El método P/A es muy útil para screening negativo de muestras en aguas, por lo que ahorra muchísimo trabajo de filtración de membrana, pero al igual que en ésta, por no existir medios de

análisis de aguas

cultivo específicos, sino selectivos/diferenciales, todo presunto positivo debe confirmarse. Partiendo de esta premisa, se establecen 3 criterios de validación:

- Eficiencia, sensibilidad y especificidad del 90% o superior (criterio ENAC): producto válido e inmejorable.
- Eficiencia del 90% o superior (criterio Microkit: sensibilidad

o especificidad se compensan sin llegar una de ellas al 90%): Producto válido de alto nivel de calidad.

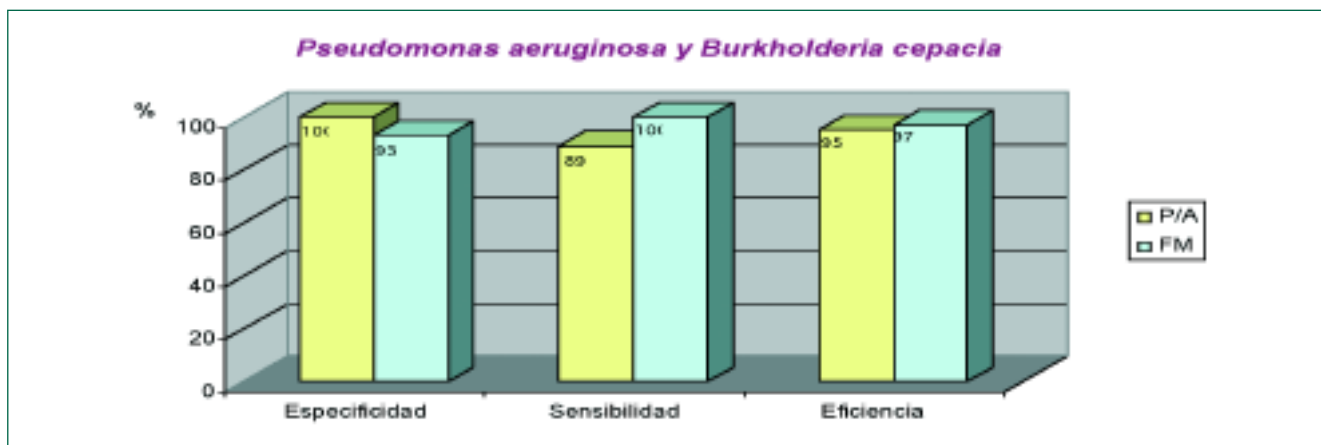
- Eficiencia del 70% o superior (criterio Pharmacopea) con sensibilidad del 90% o superior: producto válido de nivel de calidad normal, sigue sirviendo para screening negativo aunque habrá que confirmar más veces (muchos falsos positivos, por la escasa especificidad)

5. Conclusiones de los resultados obtenidos en los tres primeros años de intercomparación (2003, 2004, 2005)

5.1. *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*

P/A: La especificidad es del 100%. La sensibilidad es del 89%. La eficiencia es de un 95%. Límite de detección = desde 3 ufc/100 ml, que es el mínimo valor que se ha inoculado. Validado con calidad inmejorable.

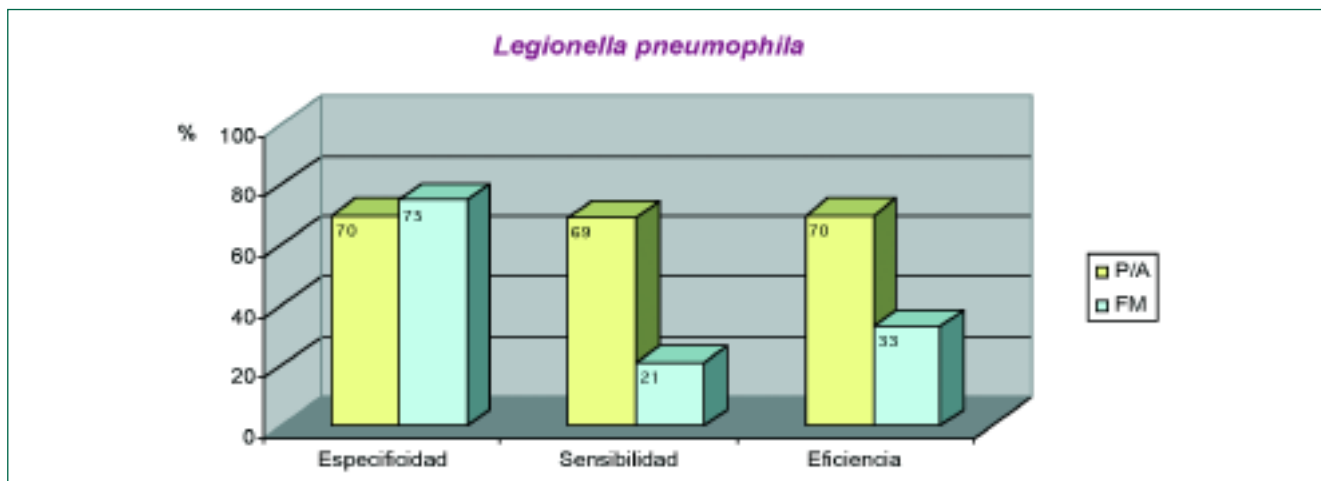
FM: La especificidad es del 93%. La sensibilidad es del 100%. La eficiencia es de un 97%. Límite de detección = desde 3 ufc/100 ml, que es el mínimo valor que se ha inoculado. Validado con calidad inmejorable.



5.2. P/A *Legionella pneumophila*

P/A: Sensibilidad del 69%, especificidad del 70% y eficiencia del 70%. Validado con calidad normal. Límite de detección = desde 30 ufc/1.000 ml, que es el mínimo valor que se ha inoculado.

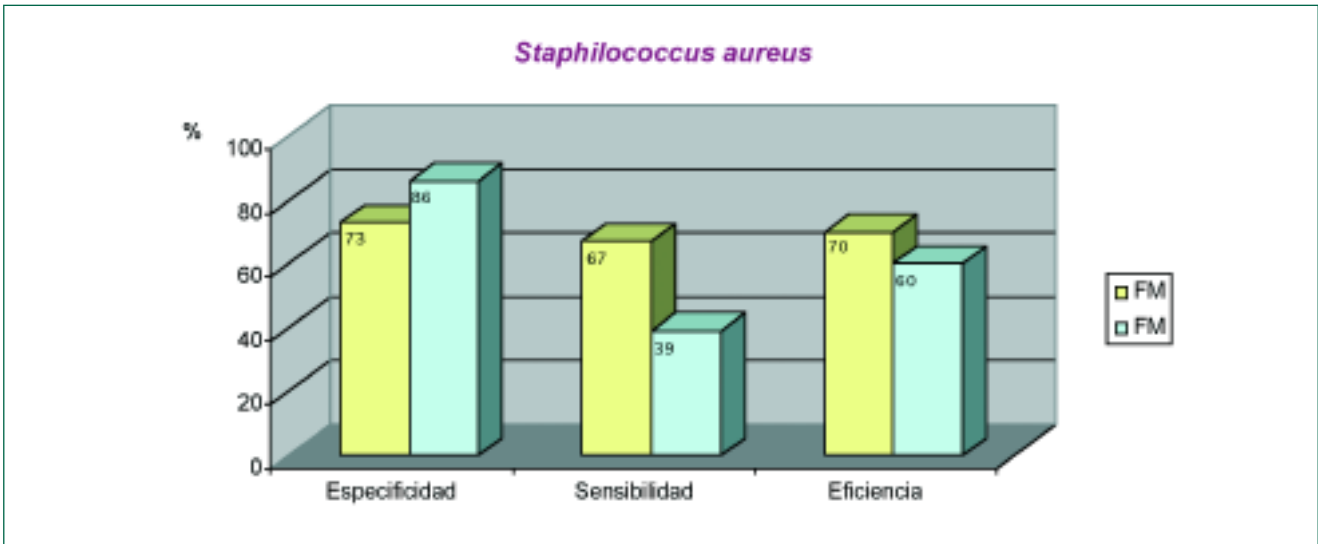
FM (ISO11731:2002): Sensibilidad del 21%, especificidad del 75% y eficiencia del 33%. Invalidado.



5.3. P/A *Staphylococcus aureus*

P/A: Sensibilidad del 67%. Especificidad del 73%, eficiencia del 70%. Validado con calidad normal. Límite de detección = desde 20 ufc/100 ml, que es el mínimo valor que se ha inoculado

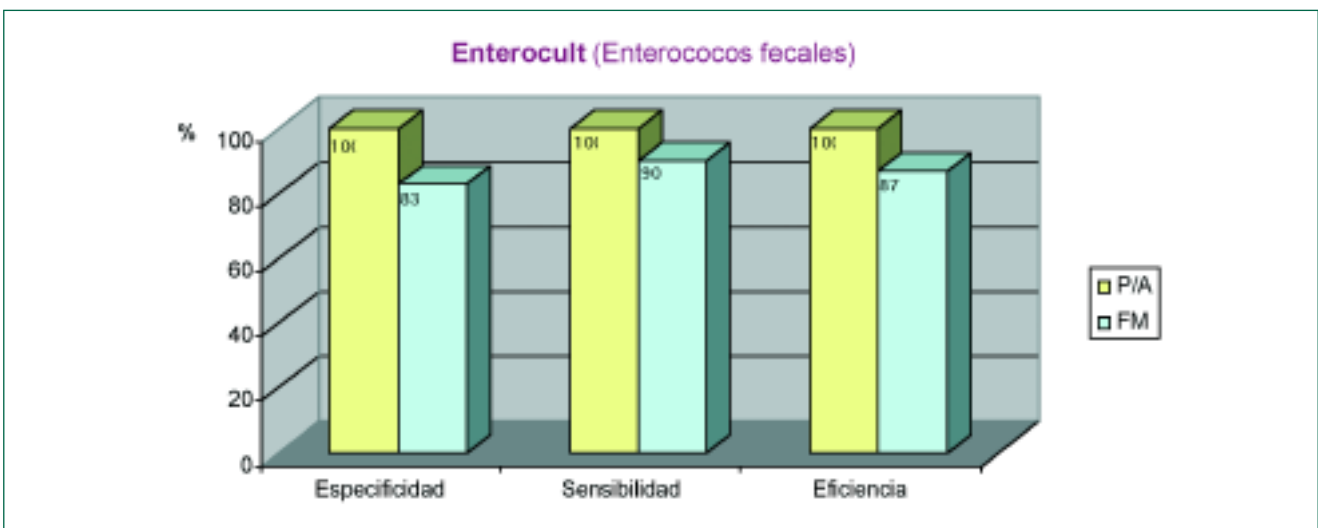
FM: Sensibilidad del 39%, especificidad del 86% y eficiencia del 60%. Invalidado.



5.4. P/A Enterocult (Enterococos fecales)

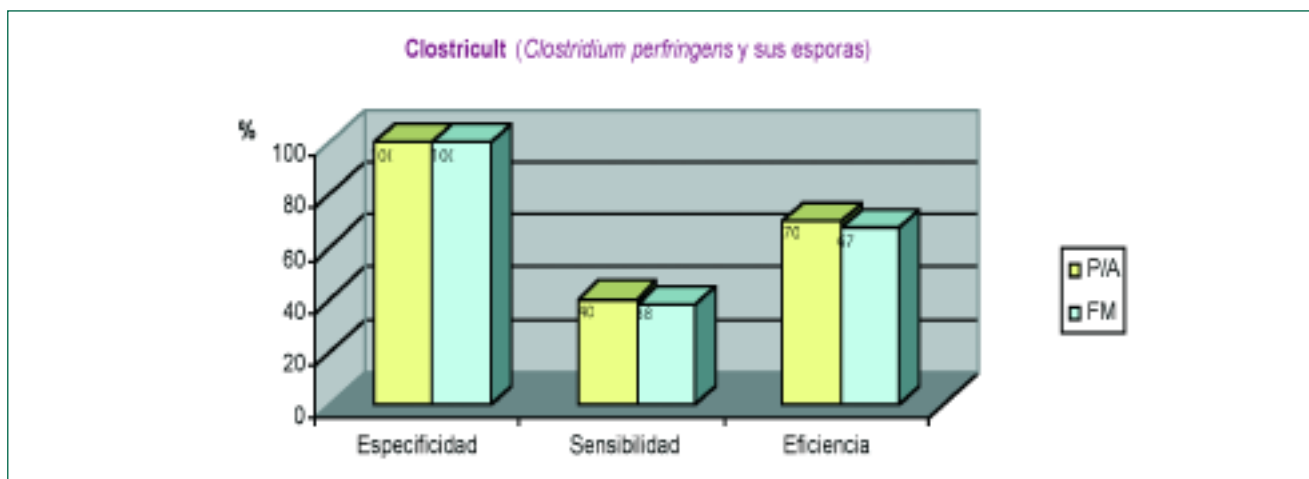
P/A: Sensibilidad, especificidad y eficiencia del 100%. Validado con calidad inmejorable. Límite de detección = desde 12 ufc/100 ml, que es el mínimo valor que se ha inoculado

FM: Sensibilidad del 90%, especificidad del 83% y eficiencia del 87%. Validado con calidad alta.



5.5. P/A Clostricult (*Clostridium perfringens* y sus esporas)

P/A: Especificidad del 100%, sensibilidad del 40% y eficiencia del 70%. Validado con calidad normal. Límite de detección = desde 20 ufc/100 ml, que es el mínimo valor que se ha inoculado. Ahora sabemos que la sensibilidad mejora muchísimo si en vez de 24 horas se incuba de 48 a 72 horas.



FM: Especificidad del 100%, sensibilidad del 38% y eficiencia del 67%. Invalidado (aproximadamente la mitad de laboratorios usan m-CP y la otra mitad, TSC).

5.6. P/A MCC Colicult (Coliformes y *E. coli*)

P/A Coliformes: Límite de detección = desde 3 ufc/100 ml, que es el mínimo valor que se ha inoculado.

FM Coliformes: Límite de detección= desde 3 ufc/100 ml, que es el mínimo valor que se ha inoculado.

P/A *E. coli*: Límite de detección = desde 3 ufc/100 ml, que es el mínimo valor que se ha inoculado.

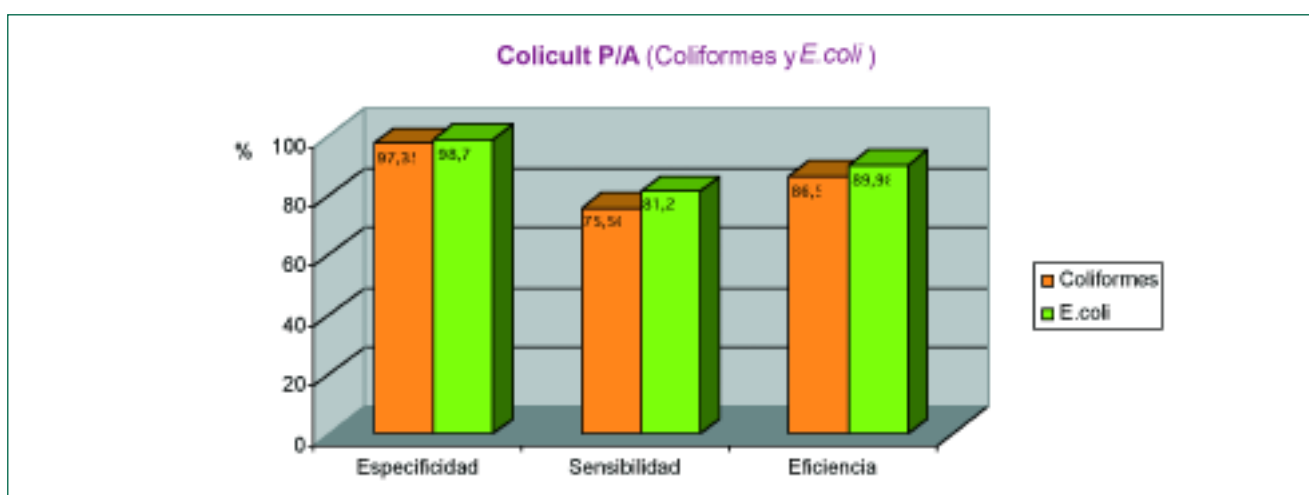
FM *E. coli*: Límite de detección = desde 3 ufc/100 ml, que es el mínimo valor que se ha inoculado.

Al no haber servicios sin inocular (ni sin coliformes, ni sin *E. coli*), no se puede establecer la especificidad con los datos intercomparativos, ni por tanto la eficiencia. Invalidable con estos datos.

Sin embargo, este kit **P/A ya estaba validado** con calidad normal (Coliformes) y alta (*E. coli*) mediante estudio intercolaborativo publicado (288 muestras duplicadas comparativas en 12 laboratorios independientes) y validación interna con 100 muestras positivas (aprox. 1 ufc/100 ml) y 100 muestras negativas (0 ufc/100 ml):

P/AColiformes: Sensibilidad 75,56%, especificidad 97,35%, eficiencia 86,5%, límite de detección 1 ufc/100 ml (10 ufc/litro) en el 86% de las muestras. Validado con calidad normal.

P/A *E. coli*: Sensibilidad 81,25%, especificidad 98,71%, eficiencia 89,98% (= 90%), límite de detección 1 ufc/100 ml (10 ufc/litro) en el 87% de las muestras. Validado con calidad alta.



6. Recomendación de Microkit

En consecuencia, animamos a todos los laboratorios de aguas (incluidos los de aguas destinadas a uso alimentario, farmacéutico, cosmético, baño, refrigeración...) para que utilicen el método más cómodo, sencillo y fiable de análisis microbiológico del agua, mediante nuestros kits validados P/A, para ahorrar así los ingentes trabajos de filtración de todas las muestras a los que estaban sometidos hasta ahora. Sólo habrán de confirmar los presuntos positivos, mediante resembrado en los medios Cetrimida Agar o CN Agar, King B Agar y

Caldo Acetamida (*Pseudomonas aeruginosa*), BPT Agar (*Burkholderia cepacia*), GVPC Agar (*Legionella pneumophila*), Mannitol Salt Agar o Baird Parker Agar (*Staphylococcus aureus*), Slanetz-Bartley Agar y Bilis Esculina Azida Agar (Enterococos fecales), TSC Agar o m-CP Agar y Lactosa-Gelatina-Nitratos-Movilidad (*Cl. perfringens* y sus esporas) y MUGPLUS Cfs. o Tergitol TTC con Triptófano-Indol (Coliformes y *E. coli*), todos ellos disponibles en Microkit en muy diversos formatos deshidratados y preparados.

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