

DEFENSA DEL MÉTODO P/A CON LOS KITS DE MICROKIT® PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS OFICIALES DE AGUAS, MEDIANTE DATOS INTERCOMPARATIVOS

Jorge Sanchis Solera. Laboratorios MICROKIT®, S.L. Apdo.44, 28210-Madrid

El método Presencia/Ausencia triunfa en análisis microbiológicos “de campo” desde la segunda guerra mundial. Gracias a los kits desarrollados por MICROKIT®, desde hace dos décadas, también triunfa en numerosos laboratorios de todo el mundo que aprecian no sólo su comodidad, sino sobre todo su efectividad, que es incluso mayor que la del método oficial de recuento de coliformes, *E.coli*, enterococos fecales, *Clostridium perfringens* y sus esporas, así como en otros parámetros del agua como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas hydrophila*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, algas, cianobacterias, levaduras y mohos (Sanchis 1,2,3,4,5; ielab 6). La única limitación del método P/A es obviamente el parámetro “recuento de aerobios”.

Sin embargo los estamentos oficiales de muchos países, incluidos los de la UE, siguen empeñados en legislar, por pura inercia histórica de métodos, que los métodos oficiales de búsqueda de patógenos sean de recuento (Filtración de membrana o NMP) incluso para luego exigir que el recuento sea 0 ufc/100 ml. Y algunos hasta creen razonable afirmar que eso no es equivalente a “ausencia” (como si en microbiología existiesen fracciones decimales de células y “cero” no fuese idéntico a “ausente”), exigiendo inviables estudios de equivalencia entre un método cuantitativo y uno cualitativo. Lo cual impide que el método P/A triunfe al nivel que debería, a pesar de que se ha demostrado no sólo como más fácil de emplear e interpretar por cualquier usuario, sino además como más robusto y seguro en aguas de consumo humano, de bebidas envasadas y de baño (continentales). Todo ello provoca que este método esté viendo limitada su aplicación al *screening* negativo de muestras primarias que resulten negativas, que no es poco; el problema es que muchos laboratorios parecen no saber que pueden usarlo así y, sólo en los casos positivos, confirmar la muestra con métodos oficiales de recuento. Lo que les ahorraría muchísimo tiempo, trabajo y dinero. Se ha puesto de moda en muchos países emplear métodos miniaturizados de NMP como *screening* negativo de muestras primarias, pero si los laboratorios sustituyeran dichos métodos por el método P/A, ahorrarían aún mucho más tiempo, trabajo y dinero, sin renunciar lo más mínimo a una máxima efectividad de sus análisis (exactitud, precisión y rango inferior “traducidas” a sensibilidad, especificidad y límite de detección).

Aportamos los últimos datos de que disponemos comparando Filtración de membrana (MF), NMP y el método P/A, que sumados a la bibliografía preexistente antes mencionada, deberían ser más que suficientes ante inspectores y auditores.

Por un lado, en un estudio comparativo de muestras naturales amablemente cedido y realizado en 2011 por el Dr. Antonio Doménech-Sánchez de Saniconsult Ibérica S.L, de Palma de Mallorca y del Área de Microbiología e Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS) de la Universidad de las Islas Baleares, se observa la similitud de resultados entre el método NMP QuanyTry de Idexx y los kits P/A de MICROKIT® para coliformes y E.coli. Las únicas 4 discrepancias de 70 muestras comparadas para coliformes aparecen en recuentos mínimos y se corresponden a 3 muestras (4,3%) con ausencias P/A y que con NMP se obtiene 1 ufc/100 ml; y a 1 muestra (1,4%) con presencia P/A y que con NMP se obtiene < 1 ufc, de modo que si se tomase este método NMP como referencia (al estar oficialmente autorizado por Sanidad), el método P/A obtendría para coliformes una sensibilidad del 95,7% y una especificidad del 98,6%. La única discrepancia de 70 muestras comparadas para E.coli aparece en una sola muestra (1,4%) con recuento NMP mínimo de 2 ufc/100 ml y ausencia por P/A, de modo que si se tomase el método NMP como referencia, el método P/A obtendría para E.coli una sensibilidad del 98,6% y una especificidad del 100%. Aún así, dado que estas discrepancias sólo se dan en los valores mínimos de recuento, afirma el autor del estudio que es muy probable que se deban a diferencias en la toma de la alícuota más que a diferencias del método (en ambos parámetros: coliformes y *E.coli*).

Por otra parte, siguiendo con nuestros estudios comparativos entre el método P/A y el método oficial de Filtración de membrana (MF), con los datos obtenidos en nuestros servicios intercomparativos SEILAGUA®, en este caso con los datos recopilados desde nuestra última publicación al respecto (1-2009) hasta el momento de la redacción de esta ponencia (4-2012) podemos observar, independientemente de los medios empleados (ya que nuestro objetivo es sólo comparar ambos métodos) y teniendo en cuenta o no cada servicio como un suceso independiente de los demás, en los 1.236 resultados comparados:

No es objetivo de este estudio confirmar el límite inferior de cuantificación/límite de detección de ambos métodos, ya demostrado en anteriores estudios, pero según los valores-inóculo de cada servicio, se demuestra que ambos métodos siguen teniendo en la mayoría de laboratorios un valor adecuado para este parámetro. Curiosamente, los 4 participantes de SEILAGUA® que usan P/A Colilert y P/A DRCM (kits P/A de otras marcas ajenas

| Microorganismo | MÉTODO MF | | | MÉTODO P/A MICROKIT® | | |
|--------------------------------|-------------|------------|------------|----------------------|------------|------------|
| | FALSOS + | FALSOS - | EFICACIA | FALSOS + | FALSOS - | EFICACIA |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 13,5-14,4% | 32,9-26,2% | 76,8-79,7% | 0% | 0% | 100% |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | 12,5-16,7% | 44,4-40,0% | 71,5-71,6% | 0% | 0% | 100% |
| <i>Legionella pneumophila</i> | 10,5-10,4% | 68,2-70,1% | 60,6-59,7% | 0% | 0% | 100% |
| <i>Legionella spp</i> | 7,4-8,3% | 78,1-80,6% | 57,2-55,5% | 0% | 28,6-25,0% | 85,7-87,5% |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 28,6-27,5% | 34,8-32,3% | 68,3-70,1% | 0% | 0% | 100% |
| <i>Escherichia coli</i> | 21,1-19,8% | 9,0-8,6% | 84,9-85,8% | 7,1-7,7% | 0% | 96,5-96,1% |
| Coliformes totales | 42,6-41,2% | 21,3-21,2% | 68,0-68,8% | 0% | 8,33-10,0% | 95,8-95,0% |
| Enterococos fecales | 60,4-57,1 % | 5,7-5,9% | 67,0-68,5% | 16,6-20,0% | 3,0-4,8% | 90,2-87,6% |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 22,5-22,0% | 46,3-49,0% | 65,6-64,5% | 4,8-6,7% | 48,0-42,9% | 73,6-75,2% |

a MICROKIT®) obtienen resultados muy aberrantes, con eficacias por debajo del 50%, por lo que hay que elegir bien el medio/marca del kit P/A para tener la seguridad de que los resultados serán satisfactorios.

Por muy incómodo que resulte aceptarlo, vuelve a quedar patente que la robustez de indicadores como *E.coli*, coliformes totales, enterococos fecales o *C.perfringens* de patógenos como *Legionella* (incl. *L.pneumophila*), *B.cepacia*, *S.aureus* y *P.aeruginosa* queda en entredicho con el sistema de filtración de membrana; no así con el método P/A con kits de MICROKIT® (algo menos, según estos últimos datos, para *Legionella spp.* y para *C.perfringens*, aunque en ellos la detección P/A sigue siendo más cercana a la realidad que el recuento MF). Por

todo ello, proponemos el uso de los kits P/A de MICROKIT® como el más cómodo, económico y eficiente método de screening negativo de muestras.

- 1: 11/1999: Estudio Intercolaborativo sobre el **método de Presencia/Ausencia** en el análisis microbiológico de aguas. XII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Oviedo, 9/2000. Se recomienda este método mejor que la Filtración de Membrana y que el método del Número Más Probable, siempre que no se requiera recuento, por su mejor sensibilidad, economía y fácil uso.
- 2: 6/2003: **Validación P/A** Intercolaborativa e Intercomparativa. Tecnicas Laboratorio. El método más sensible en agua para *E.coli*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* y hasta 5 veces más sensible que el método de Filtración de membrana entre los 11 parámetros microbiológicos comparados.
- 3: 5/2006: **Validación microbiológica de los Kits P/A MICROKIT®** frente a la Filtración de Membrana en el servicio intercomparativo SEILAGUA®, mediante una novedosa hoja de cálculo. Técnicas de Laboratorio-312.
- 4: **03-2009: VALIDACION COLIFORMES Y E.coli EN MICROBIOLOGÍA DE AGUAS.** Validación y estudio de equivalencia de MUGPLUS Agar y MCC P/A Broth en aguas. 7 pp. MICROKIT® 31-Marzo-2009
- 5: **07-2009: VALIDACION MICROBIOLOGÍA DE AGUAS.** Validación de análisis de aguas. 11 pp. MICROKIT® 09-Julio-2009
- 6: **07-2011: VALIDACIÓN DEL CLOSTRICULT P/A.** Estudio intercolaborativo entre 12 laboratorios acreditados ISO17025, para el parámetro *Clostridium perfringens* en aguas, coordinado por ielab, que compara este kit con el método de filtración de membrana con m-CP Agar, TSC Agar y TSCMUP Agar, y demuestra que el Clostricult P/A es el más sensible, específico, eficaz, concordante y conforme. Estudios previos de MICROKIT® prueban que también es el que detecta desde el más bajo límite de detección.