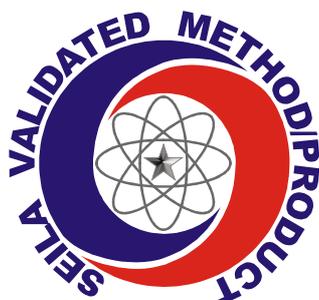


CERTIFICADO DE VALIDACIÓN/EQUIVALENCIA



Certificamos que el método y/o productos:

Protocolo intercomparativo SEILAGUA® para análisis microbiológicos de aguas (presentaciones y referencias MICROKIT® entre paréntesis) (PRT-SEILA-002, de 39 páginas, y PNT-AG-006, de 48 páginas "Investigación y Recuento de Coliformes y *E.coli* en aguas"), llevado a cabo mediante los medios de cultivo en él indicados, en concreto los métodos y medios/kits para **Coliformes y *E.coli*: Agar MugPlus que incluye Triptófano, Salmon-Gal y X-Glu** (polvo: DMT400, tubos: TPL400, frascos: RPL444, plaquitas herméticas MF: PPL902, Compact-Dry-Plates®-EC: 1000168) y **Caldo MCC que incluye Lauryl Sulfato, Triptófano, MUG y X-Gal** (polvo: DMT900, tubos: TPL637 y su versión **MCC P/A COLICULT**: frascos tomamuestras estériles: RPL303, viales de polvo irradiado: FPA900),

Cumplen con los estándares de VALIDACIÓN de la Norma UNE-EN-ISO 16140:2003, cuyos resultados se anexan. La validación está realizada mediante comparación utilizando cepas cuantitativas certificadas y trazables, frente a los métodos oficiales de referencia (Reales Decretos 1074/2002 y 140/2003, que redirigen a las respectivas Normas Técnicas vigentes ISO/UNE para microbiología de aguas). También se añaden los datos de **equivalencia** que demuestran que dichos métodos alternativos son al menos tan fiables como el de referencia.

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

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

Garantizado por:

A fecha: 31-Marzo-2009

Jorge Sanchis Solera

Coordinador SEILAGUA® y Director de Calidad MICROKIT®

❖ METODO DE VALIDACIÓN

Se compara un mínimo de **100 muestras** para cada uno de los dos parámetros microbiológicos (Coliformes y *E.coli*), la detección presencia/ausencia y el recuento obtenido siguiendo el **método MICROKIT®** (protocolo PRT-SEILA-002 y PNT-AG-006- Investigación y Recuento de Coliformes y *E.coli* en aguas) con **cepas cuantitativas certificadas HPA**, con respecto al método oficial UNE-EN ISO 9308-1 "Calidad del agua. Detección y recuento de *E. coli* y de bacterias Coliformes", basado en filtración de membrana y recuento en Agar Lactosado con Tergitol y TTC. Para ello se utilizan los **medios de cultivo MICROKIT®** descritos en dichos protocolos (MUGPLUS Agar para recuento de *E.coli* -colonias azules y prueba positiva directa de indol- y demás coliformes -colonias rosas-, así como MCC Broth para P/A de coliformes -viraje del agua a azul- y *E.coli* - fluorescencia del agua en oscuridad bajo luz UVA de 366 nm y prueba positiva directa de indol-).

Hacemos notar que la composición del MUGPLUS Agar es exactamente la expuesta en la Orden SCO/778/2009 del Ministerio de Sanidad y Consumo (17-Marzo-2009), publicada en el BOE 31/Marzo/2009 sobre métodos alternativos para el análisis microbiológico del agua de consumo humano. Y que el MCC P/A Broth también busca exactamente las dos enzimas que en él se indican como definición de coliforme (\$-D-galactosidasa) y de *E.coli*. (\$-D-galactosidasa y \$-D-glucuronidasa). Dicha Orden habla de **métodos** "se podrán utilizar asimismo los métodos incluidos en el anexo de esta orden" y no de marcas comerciales, lo cual sería gravemente ilegal.

Por otra parte, se aprovecha para compararlos con los resultados obtenidos en matrices idénticas con inóculos idénticos, por los 70 laboratorios españoles participantes en el servicio intercomparativo SEILAGUA® de los últimos 7 años, con un total de 28 tandas que suponen la comparación de más de **700 muestras** idénticas entre los participantes que utilizan el **MÉTODO DE REFERENCIA** y el **método MICROKIT®**, lo cual sirve además como **re-validación periódica** de éste. Dada la homogeneidad de resultados, resumidos en la publicación intercomparativa "12/2007: **Protocolos MICROKIT** para control microbiológico de aguas, VALIDADOS mediante 6 años de ensayos intercomparativos SEILAGUA®. Técnicas de Laboratorio 332, 6/2008. VII Reunión Microbiología acuática SEM. Bilbao 9/2008", en la validación y estudio de equivalencia no se tienen en cuenta los datos de todas las muestras, sólo las de los dos últimos años, ya que hacerlo sólo multiplicaría un trabajo estadístico que resultaría redundante. De entre los 70 laboratorios participantes, al menos 6 están acreditados para análisis microbiológicos de Coliformes y *E.coli* por la Norma ISO 17025, conforme solicita la ISO 17994 de equivalencia de métodos microbiológicos.

Las **MATRICES** empleadas fueron aguas de consumo, aguas envasadas, aguas de baño -piscinas-, aguas brutas continentales, aguas purificadas farmacéuticas y aguas de refrigeración de aires acondicionados.

Restricciones de uso del protocolo y los medios y kits de MICROKIT®: El alcance de la validación no incluye aguas marinas o salobres, no porque estén invalidados en ellas, sino simplemente porque todavía no se han comprobado en las mismas, lo cual se realizará en una validación posterior.

❖ RESULTADOS

En letra azul, los resultados de MICROKIT para detección y recuento en Agar MUGPLUS en cualquiera de sus presentaciones.

En letra verde, los resultados de MICROKIT para detección Presencia/Ausencia (P/A) con caldo MCC P/A en cualquiera de sus presentaciones.

En letra negra los resultados del método de referencia con Tergitol TTC. No se tienen en cuenta terceros métodos (aunque podemos señalar que los resultados de ambos métodos MICROKIT son también mejores que los obtenidos con los agares Endo y MFC). Tampoco se tienen en cuenta los participantes de SEILAGUA® que no aplican estrictamente el método de referencia.

1. TABLA DE RESULTADOS DE PARAMETROS CUALITATIVOS

	SENSIBILIDAD (S) (escasez de Falsos Negativos)		ESPECIFICIDAD (E) (escasez de Falsos Positivos)	
	Falsos -	% S	Falsos +	% E
MUGPLUS Agar Coliformes (C) y <i>E.coli</i> (E)	(C) 4 de 101 (E) 3 de 121	96,04 % 97,52 %	(C) 1 de 101 (E) 1 de 121	99,01 % 99,17 %
MCC Broth Coliformes (C) y <i>E.coli</i> (E)	(C) 0 de 110 (E) 0 de 118	100 % 100 %	(C) 0 de 110 (E) 0 de 118	100 % 100 %
METODO DE REFERENCIA	(C) 2 de 87 (E) 4 de 92	97,70 % 95,65 %	(C) 5 de 87 (E) 5 de 92	94,25 % 94,57 %

Observamos que la eficiencia de los tres métodos es excelente, pero que la máxima sensibilidad y especificidad la tiene el MCC Broth, seguido de la gran especificidad del MUGPLUS Agar (que nos ahorra tantas confirmaciones estériles) y de la gran sensibilidad del Tergitol TTC Agar para coliformes, nuevamente mejorada en *E.coli* por el MUGPLUS Agar.

LIMITE DE DETECCIÓN CONFIRMADO DESDE *:	
MUGPLUS Agar Coliformes (101 muestras) y <i>E.coli</i> (121 muestras)	5 ± 2 ufc/100 ml (coincide en ambos parámetros al ser <i>E.coli</i> un coliforme)
MCC Broth Coliformes (110 muestras) y <i>E.coli</i> (118 muestras)	3 ± 2 ufc/100 ml (coincide en ambos parámetros al ser <i>E.coli</i> un coliforme)
METODO DE REFERENCIA Coliformes (87 muestras) y <i>E.coli</i> (92 muestras)	5 ± 2 ufc/100 ml (coincide en ambos parámetros al ser <i>E.coli</i> un coliforme)

* Hacemos notar que la incertidumbre microbiológica, a causa de la distribución contagiosa de microorganismos (Poisson o binomial negativa), nos impide afirmar que dos submuestras de agua recién agitada son idénticas; por tanto nos impide asegurar, de una forma estadísticamente fiable, límites de detección inferiores a los mencionados, ya que en una submuestra puede haber 1 ufc, en otra 2 y en otra ninguna. Se observa que el método MICROKIT, sobre todo en el caso del MCC P/A, se acerca mucho más al límite de detección ideal (teórico de 1 ufc/100 ml) que el método de referencia, tanto en coliformes como en *E.coli*. Además, un estudio interno con 100 tripletes de muestras comparadas a las que se inocularon cantidades lo más

homogéneas posible (agitadas inmediatamente antes de inocular) de agua de grifo de Valdemorillo-Madrid con 100 ufc de *E.coli* en cada uno de los 10 litros necesarios (teóricamente 1 ufc/100 ml, 30 l del triplete), demostró que el límite de detección del método MICROKIT en ellos es tan cercano a 1 ufc/100 ml como estadísticamente puede afirmarse, en el 79-86 % de las muestras (ya que dieron positivo), mientras en el método de referencia era sólo detectado en el 53% de las muestras (ya que en el 47% restante no hubo crecimiento colonial). La imprecisión debida a la imposibilidad de mejorar el reparto homogéneo de cepa en las submuestras, nos permite intuir que el límite de detección de *E.coli* (como tal y como coliforme) en la realidad, se acerca mucho a 1 ufc/100 ml en el 100% de las muestras mediante el MCC P/A.

2. TABLA DE RESULTADOS DE PARAMETROS CUANTITATIVOS

	EXACTITUD	PRECISIÓN (medida como Imprecisión)
MÉTODO DE REFERENCIA Coliformes (C) y <i>E.coli</i> (E)	(C) en 87 muestras <1,17143 log OK (E) en 92 muestras < 0,871428 log OK	(C) < ± 0,54 log, (y 15 % de muestras estaban fuera de rango): OK (E) < ± 0,39 (y 12 % de muestras estaban fuera de rango): OK
MUGPLUS Agar Coliformes (C) y <i>E.coli</i> (E)	(C) en 101 muestras < 0,53375 log OK (E) en 121 muestras < 0,66857 log OK	(C) < ± 0,47 log, (y 7 % de muestras estaban fuera de rango): OK (E) < ± 0,33 (y 3 % de muestras estaban fuera de rango): OK

No se incluye el MCC Broth, al ser un método cualitativo (de presencia/ausencia).

Se observa una mayor exactitud en el método MUGPLUS tanto para coliformes como para *E.coli*, con una ventaja sobre el Tergitol TTC de 0,63768 log en el primer caso y de 0,202858 log en el segundo, aunque todos ellos están dentro de los límites aceptados por los estadísticos de ± 2 log.

En cuanto a la precisión, en todos los casos está dentro de los límites marcados por los estadísticos de ± 2 log. Además no se aprecian diferencias significativas entre ambos métodos, puesto que buena parte de la imprecisión detectada se puede deber al componente analista, más que al componente medio de cultivo. Lo que si apreciamos es que hay muchas más muestras en Tergitol TTC que están fuera de rango (incontables y por tanto no incluidas en el estudio) que las encontradas en el MUGPLUS, lo que da otro punto a favor de éste.

3. ESTUDIO DE EQUIVALENCIA

A la vista de los datos comparados parece redundante elaborar un **estudio de equivalencia** para demostrar que el método MUGPLUS Agar y el método MCC P/A funcionan al menos tan bien como el método de referencia; sin embargo para contentar a las instituciones más puristas, se calcula, según los principios del procedimiento UNE-EN-ISO 17994 " Calidad del agua: Criterios para establecer la equivalencia entre métodos microbiológicos". Para ello se busca la diferencia relativa media del ln de x de

recuentos/detecciones confirmados con respecto a un valor D del 10%, de modo que si resulta positivo, se considera que el método alternativo es al menos tan adecuado como el método de referencia. Los resultados obtenidos son:

	MEDIA x total 6 tandas de un total de 185 muestras			DIFERENCIA RELATIVA MEDIA	
	METODO DE REFERENCIA (x ufc/100 ml)	MUGPLUS Agar MICROKIT (x ₁ ufc/100 ml)	MCC Broth MICROKIT (x ₂ presente/100ml)	ln x - ln x ₁ ó ln x - ln x ₂	
Coliformes	79133	78000	+	-0,01442	+
	97	147	+	+0,41572	+
	50000	61000	+	+0,19885	+
	177	229	+	+0,25757	+
	140	243	+	+0,55142	+
	2300	2000	+	-0,13976	+
	TOTAL	TOTAL	++++++	+0,13 OK	OK
<i>E.coli</i>	46800	46300	+	-0,01074	+
	48	203	+	+1,44201	+
	27514	56500	+	+0,71955	+
	136	101	+	-0,29754	+
	110	280	+	+0,93431	+
	5100	3750	+	-0,30748	+
	TOTAL	TOTAL	++++++	+2,48 OK	OK

No hacía falta esta aplicación estadística para obtener la misma conclusión, ya que el recuento confirmado en MUGPLUS en los servicios intercomparativos SEILAGUA® es reiteradamente más cercano al valor inóculo que en Tergitol TTC, ya que este disparata los resultados, que luego se confirman como negativos. En ambos casos se confirma la equivalencia de los métodos alternativos propuestos por MICROKIT frente al método de referencia, incluso en beneficio del método MUGPLUS, sobre todo para *E.coli*. Cabe resaltar que numerosas placas del método de referencia estaban tan abarrotadas de colonias de presuntos falsos positivos, que resultaba realmente tedioso trabajar con el medio Tergitol TTC, y era un trabajo ingente confirmar las colonias sospechosas que en numerosos casos no resultaban ser ni coliformes ni *E.coli*. Es lo que ocurre cuando se elige un medio diferencial no selectivo pretendiendo que haga el papel de un medio selectivo. El Tergitol TTC se diseñó hace más de un siglo para aislar en estría colonias sospechosas procedentes de medios selectivos, no para usar directamente como medio selectivo, inoculando una membrana de filtración. Para esta técnica se demuestra aquí que funciona mucho mejor el MUGPLUS Agar.

❖ CONCLUSIONES

1- Ambos métodos MICROKIT, utilizados al pie de la letra e independientemente de sus presentaciones, con el medio de cultivo MICROKIT MUGPLUS Agar, así como con el kit MCC P/A Broth, quedan validados y son, al menos, tan fiables como el método de referencia, o incluso más. Detectan y/o recuentan, en todos los casos, las concentraciones adecuadas de los dos grupos de microorganismos estudiados (Coliformes y *E.coli*). Además, lo hacen como mínimo, tan bien como el método de referencia, demostrando unas muy superiores sensibilidad y especificidad, una mayor cercanía al límite de detección mínimo necesario, así como mejor robustez, facilidad de uso y economía que el método de referencia, en su implantación en los distintos laboratorios que los aplican.

2- No es la primera vez que se demuestra así, como en estudios similares de otras marcas comerciales, que la detección de la enzima β -D-Galactosidasa (cromógenos Salmon-Gal y X-Gal) es más específica para coliformes que la detección de la clásica prueba de fermentación de la lactosa en que se basa el método de referencia. Y que la detección de la enzima β -D-Glucuronidasa (fluorógeno MUG) es más específica para *E.coli* que la simple prueba del indol para colonias de coliformes en que se basa el método de referencia.

3- La escasez de falsos positivos o mayor especificidad (>99 % en ambos parámetros) en el MUGPLUS Agar, permite a los laboratorios ahorrar tiempo y dinero en las confirmaciones de los falsos positivos que sí son necesarias en el método de referencia. Además en el MUGPLUS Agar, la escasa aparición de acompañantes con respecto al Tergitol TTC, facilita el recuento y el aislamiento de colonias puras.

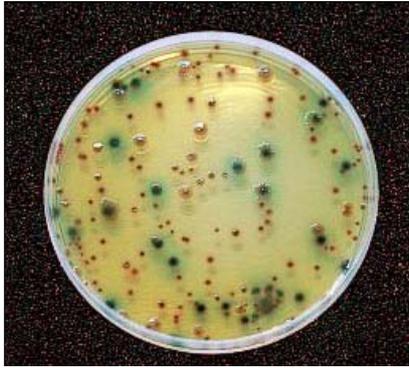
4- La absoluta escasez de falsos negativos o máxima sensibilidad del método MCC P/A (100 %), aconseja utilizarlo como método de screening negativo, sobre todo cuando se requiere el despistaje de un alto número de muestras negativas, confirmando sólo los presuntos positivos (por prudencia, ya que la especificidad del MCC P/A es también de un inmejorable 100 %) por estría en un agar adecuado como demuestra ser el MUGPLUS. La mayor facilidad de uso del método P/A permite realizar muchas más muestras sin necesidad de aparatos de filtración, al tiempo que se disminuye el número de puntos críticos del análisis y por tanto se aumenta la robustez.

5- Hemos demostrado en otros estudios similares de validación, que los métodos de detección y recuento de Enterococos fecales en aguas, son mucho más robustos que los métodos de detección de Coliformes y *E.coli* en aguas, sean cuales sean los laboratorios y los métodos de búsqueda de este otro indicador de contaminación fecal (sea método de referencia o sea método MICROKIT P/A Enterocult). Esta mejor facilidad de detección/recuento correcto, unida al hecho de la muy superior longevidad de los Enterococos fecales en el agua (según bibliografía, 1-2 semanas contra 1-2 días de *E.coli*), nos exigen proponer la implantación de su búsqueda con una frecuencia al menos tan importante como la búsqueda de Coliformes y *E.coli*, es decir, rutinariamente y a diario. La detección en una muestra de Enterococos fecales sin detección de Coliformes-*E.coli* no siempre significará que la contaminación fecal tuvo lugar hace más de dos días, ya que, como hemos visto, los métodos de referencia no siempre encuentran Coliformes-*E.coli* cuando en realidad sí están presentes mientras, por el contrario, ningún laboratorio reporta falsos negativos de Enterococos fecales. Por otra parte, diferenciar éstos de los estreptococos fecales nos parece un academismo nada práctico, ya que en realidad ambos son indicadores de contaminación fecal y sirven para el mismo fin.

6- Confiamos que todo este trabajo, fruto de un tremendo esfuerzo conjunto en los 7 últimos años por parte de 70 de los laboratorios de toda España que utilizan los métodos, medios y/o kits de MICROKIT, sea bien aceptado por las entidades de acreditación e inspección en aras a una mejora de la calidad analítica y del menor coste y derroche para los laboratorios y el medio ambiente que estos métodos implican, lo que incentivará que desde esta empresa podamos seguir diseñando en España métodos más eficientes para otros parámetros microbiológicos (como por ejemplo las esporas de *Clostridium*, indicadoras de posible presencia de Enterovirus y protozoos como *Cryptosporidium*, *Entamoeba* y *Giardia*) y evitará que los laboratorios acreditados y los autorizados por Sanidad se estanquen en métodos clásicos que son muy optimizables, gracias a un concepto que nunca debe olvidarse en ningún laboratorio: la mejora continua sin trabas burocráticas que la limiten.

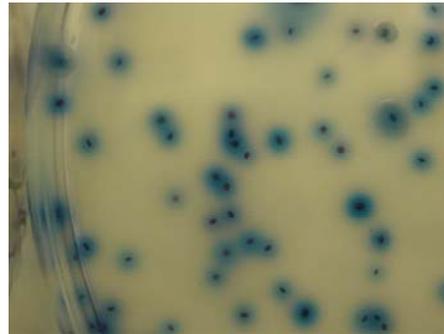
❖ ANEXO FOTOGRÁFICO

1-MUG PLUS AGAR



En MUGPLUS Agar, *E.coli* crece con colonias azules (X-Glu positivas), mientras los demás coliformes crecen con colonias rosadas (Salmon-Gal positivas). Otros microorganismos pueden crecer con colonias de otros tonos, pero esta flora acompañante queda muy disminuida si se siembra en masa o se añade asepticamente el suplemento estéril MICROKIT SMS400 Cefsulodina+Vancomicina. Una ventaja adicional del medio es que es capaz de detectar también cepas patógenas atípicas de *E.coli*, como la O157:H7, que es Salmon-Gal +, X-Glu- e Indol +, por lo que crece con colonias rosas con halo rosa de indol al añadir reactivo de Kovacs sobre el mismo medio.

Inconfundibles colonias azul-añil de *E.coli* en MUGPLUS Agar. Para los analistas que diferencian peor las gamas intermedias entre los colores azul y rojo, es decir, lila, violeta, etc, el MUGPLUS Agar es el medio cromogénico idóneo, ya que los diversos coliformes son rosados y rojizos, mientras las colonias lilas, violetas y azules son de diferentes cepas de *E.coli*.



2-MCC COLICULT P/A BROTH



La presencia de coliformes queda detectada en MCC Broth por viraje del agua a azul (X-Gal) en 4-18 horas. La presencia de *E.coli* por fluorescencia azul bajo luz UVA de 366 nm (MUG) y anillo rojo de indol al añadir directamente reactivo de Kovacs. Una ventaja adicional del medio es que es capaz de detectar también cepas patógenas atípicas de *E.coli*, como la O157:H7, ya que son X-Gal+, MUG- e indol +, por lo que viran el agua a azul, sin fluorescencia pero con anillo rojo de indol positivo tras añadir Kovacs.

La presentación de los kits P/A cromogénicos es doble: o bien en frascos tomamuestras, como los de la fotografía de la izquierda (con Tiosulfato sódico incluido), o bien en viales/tubos prepesados de polvo irradiado-estéril, como los de la fotografía de arriba (sin Tiosulfato sódico incluido), para añadir a 100 ml del agua de muestra en la búsqueda de los diversos parámetros microbiológicos del agua.