

## VALIDACIÓN DEL MÉTODO P/A (PRESENCIA/AUSENCIA) PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS E INDICADORES EN AGUAS, MEDIANTE UN ESTUDIO INTERCOLABORATIVO Y OTRO INTERCOMPARATIVO

Participantes: M<sup>a</sup> José Muñoz, Rubén Alvarez, Agua de Quess, Asturias. Laura Muro Molina, AMVISA, Alava. Antonio Gutiérrez, Santiago Ortega, Angel Casañas, Compañía Cervecera de Canarias, S.A., Fábrica 03, Las Palmas de Gran Canaria. (†) Juan José Marcén Letosa, Laboratorio Municipal de Zaragoza. Angélica Morales, Sandra Casillas, Miriam Ibáñez, Covadonga Estévez Laboratorios MICROKIT, S.L. José Luis Escamilla Francés, José Luis Sánchez de la Nieta, Nieves Almodóvar Díez, Miguel Angel García Sancha, Policlínica Naval de Madrid. José Luis Martínez, Luisa Lodeiro, Sanidad de La Coruña, Xunta de Galicia. Juan Gozalbo, Jordi Cid, SACIM, S.L. Catí, Castellón. Federico Santana Orihuela, Sersanyam, Las Palmas de Gran Canaria. Manuel Sarmiento, M<sup>a</sup> Luz Sanz, Luis M.Fuertes, Grupo General de Aguas SOGESUR, Avila. Manuel Liceras Cardenal, privado. Y otros 39 laboratorios, ANÓNIMOS, por ser participantes en el servicio intercomparativo SEILAGUA. Coordinador: Jorge Sanchis Solera, Laboratorios MICROKIT, S.L. (Pre-publicado resumen del primer tercio de este estudio en el XII Congreso de microbiología de Alimentos, Oviedo, 9/2000, donde faltaban los parámetros de sensibilidad, especificidad y límite de detección.)

El estudio incluyó 3 fases: **1<sup>a</sup> fase:** Se analizaron, entre los años 1997 y 2000, un total de 248 duplicados de muestras naturales de aguas (de la red de aguas potables, de mar, y de plantas embotelladoras de bebidas de consumo humano), para los parámetros más habituales entonces: Coliformes y *E.coli*, entre un total de 10 laboratorios independientes repartidos por toda la geografía española, 2 de ellos de la Administración pública y 8 privados. En el año 2003 se añadieron a la lista de participantes otros 2 laboratorios privados, otras 40 muestras.

Se compararon los resultados de presencia/ausencia de los 2 parámetros microbiológicos diferentes (Coliformes y *E.coli*), con respecto a los obtenidos con el método de filtración de membrana, hoy método de referencia. El medio de P/A, cedido por Laboratorios MICROKIT a los participantes, fué el Caldo MCC-COLICULT (Lauryl MUG+X-Gal) para Coliformes (se consideró positivo todo viraje a azul, en 24 h a 37°C) y *E.coli* (se consideró positivo todo agua fluorescente bajo luz U.V.A. de 366 nm, en 24 h a 37°C). Los medios MF para comparación fueron: ENDO para coliformes totales (se consideró como coliforme toda colonia roja y como *E.coli* toda colonia roja con brillo metálico, en 24 h a 37°C). M-FC/M7hFC para coliformes fecales (se consideró como coliforme fecal-presunto *E.coli* toda colonia azul, en 24 h a 44,5°C). Tergitol 7-Chapman TTC Agar (aunque todos sabemos que esto implica muchos falsos positivos, se consideró como coliforme toda colonia amarilla o naranja y como *E.coli* toda colonia amarilla con centro naranja, en 24 h a 37°C). Lamentablemente nadie identificó los presuntos positivos de cada método, invalidando así el estudio, por lo que hubimos de tomar el método MF como método patrón, aunque no estemos de acuerdo en absoluto: Efectivamente, durante estudios previamente realizados en USA en los años 1970, el método MF obtuvo, con ENDO, ¡un 36% de falsos negativos confirmados con respecto al método P/A! Para Coliformes, 59 de 248, el 23,79% de las muestras, fué positivo por alguno de los dos métodos, el 76,21% negativo. Para *E.coli*, 16 de 248, el 6,45% de las muestras, fué positivo por alguno de los dos métodos, el 93,55% negativo. Los resultados estadísticos hubieran resultado más significativos si se hubieran conseguido aproximadamente un 50% de aislamientos positivos y un 50% de negativos, para cada parámetro. Por ello, en nuestro caso, tenderá a conocerse con mayor grado de fiabilidad la selectividad/especificidad que la sensibilidad. Sin embargo, 59 positivos para coliformes y 16 positivos para *E.coli* resultan muy representativos, ya que se cumple sobradamente el mínimo requerido en validaciones de 10 muestras, por lo que los resultados de sensibilidad también son estadísticamente significativos. Por fin, los resultados con agua de mar son muy dispares, aunque parece haber unanimidad en el exceso de resultados falsamente positivos, que no aconsejan el uso del método P/A para Coliformes/*E.coli* en aguas marinas.

**2ª fase:** El estudio de límites de detección fue íntegramente realizado durante 2002 por Laboratorios MICROKIT, S.L, con un triplicado de 100 muestras de 100 ml cada una.

**Sensibilidad (y falsos negativos) del método P/A frente al MF, parámetro COLIFORMES:**

De los 59 aislamientos presuntamente positivos para coliformes:

En P/A se aislaron 45 muestras positivas (76,27%), de las que 14 eran contrastando con Endo y 34 con Tergitol 7-Chapman TTC.

En MF (suma de todos los medios) se aislaron 54 muestras positivas (85,71%).

Para el medio ENDO, se aislaron 12 positivos, frente a 14 positivos aislados por P/A, lo que indica que el método P/A es un 14,29% más sensible que el método MF con Endo.

Para el medio Tergitol 7-Chapman TTC, se aislaron 45 positivos, frente a 34 positivos aislados por P/A, lo que indica que el método MF con Tergitol 7-Chapman TTC sería un 24,44% más sensible que el método P/A, SI SE HUBIESEN CONFIRMADO COMO POSITIVOS TODOS LOS AISLAMIENTOS PRESUNTIVOS DEL Tergitol 7-Chapman TTC. Todos sabemos que no es así, por lo que hemos de tomar estos datos con suma cautela.

MEDIO (Y MÉTODO)	TERGITOL 7-CHAPMAN TTC (MF)	MCC COLICULT (P/A)
SENSIBILIDAD	AL SER EL MEDIO Y MÉTODO DE REFERENCIA, SERÍA EL 100%	34/45= 75,56%
FALSOS NEGATIVOS	0 DE 45 PRESUNTOS POSITIVOS	11 DE 45 PRESUNTOS POSITIVOS

MEDIO (Y MÉTODO) PARA COLIFORMES	ENDO AGAR (MF)	MCC COLICULT (P/A)
SENSIBILIDAD	12/14=85,71%	CON RESPECTO AL ENDO, SERÍA EL 100%
FALSOS NEGATIVOS	2 DE 14 PRESUNTOS POSITIVOS	0 DE 14 PRESUNTOS POSITIVOS

**Lo que sí se puede concluir es que, para COLIFORMES, el método P/A se coloca, en cuanto a sensibilidad (escasez de falsos negativos con respecto al total de positivos), entre los dos medios más universales del método MF: ENDO y Tergitol 7-Chapman TTC. Por ello, este parámetro queda validado para el método P/A.**

**Sensibilidad (y falsos negativos) del método P/A frente al MF, parámetro *E.coli*:**

De los 16 aislamientos presuntamente positivos para *E.coli*:

En P/A se aislaron 13 muestras positivas (81,25%), de las que las 13 eran contrastando con MFC/M7hFC y ninguna con Tergitol 7-Chapman TTC.

En MF (suma de todos los medios, aunque en Tergitol 7-Chapman TTC no se obtuvo ningún positivo para *E.coli*) se aislaron 11 muestras positivas (68,75%).

Para el medio Tergitol 7-Chapman TTC, se aislaron 0 positivos, frente a los otros 11 positivos aislados en MFC/M7hFC y frente a los 13 positivos aislados por P/A, lo que indica que el método MF con Tergitol 7-Chapman TTC tendría un 0% de sensibilidad para *E.coli*, el método MF con MFC/m7hFC tendría un 68,75% de sensibilidad para *E.coli* y el método P/A un 81,25% de sensibilidad para *E.coli*, la máxima conseguida.

MEDIO (Y MÉTODO) PARA <i>E.coli</i>	TERGITOL 7-CHAPMAN TTC (MF)	MFC/M7hFC (MF)	MCC COLICULT (P/A)
SENSIBILIDAD	0%	68,75	13/16= 81,25%
FALSOS NEGATIVOS	16 DE 16 POSITIVOS	5 DE 16 POSITIVOS	3 DE 16 POSITIVOS

Se concluye que, para *E.coli*, el método P/A se coloca, en cuanto a sensibilidad (escasez de falsos negativos con respecto al total de positivos), en cabeza, muy por encima de los dos medios más universales del método MF: M-FC (y M7hFC) y Tergitol 7-Chapman TTC. Por ello, este parámetro queda validado para el método P/A.

**Especificidad (y falsos positivos) del método P/A frente al MF, parámetro COLIFORMES:**

De los 189 aislamientos negativos para coliformes:

En P/A (5 falsos positivos de 189 muestras negativas), la especificidad para Coliformes resulta ser del 97,35 %.

En MF (14 falsos positivos de 189 muestras negativas), la especificidad para Coliformes resulta ser del 92,59%. De ellos, 2 son en ENDO (98,94%) y 12 en Tergitol 7-Chapman TTC (93,65%).

MEDIO/MÉTODO	ENDO/MF	TERGITOL/MF	MF (GLOBAL)	MCC P/A
ESPECIFICIDAD	98,94%	93,65%	92,59%	97,35%
FALSOS +	2 DE 189	12 DE 189	14 DE 189	5 DE 189

Salta a la vista que el mejor método en cuanto a especificidad (escasez de falsos positivos con respecto al total de negativos) para Coliformes es el P/A. Si se compara con el medio de referencia, el Tergitol 7-Chapman TTC, ganamos un 3,7% de especificidad, es decir, nos ahorramos confirmar el 3,7% de las muestras presuntamente positivas. El medio Endo resulta aún más selectivo, pero ya se vió que resultaba el menos sensible de los 3 medios. Por ello, este parámetro queda validado para el método P/A.

**Especificidad (y falsos positivos) del método P/A frente al MF, parámetro *E.coli*:**

De los 232 aislamientos negativos para *E.coli*:

En P/A (3 falsos positivos de 232 muestras negativas), la especificidad para *E.coli* resulta ser del 98,71 %.

En MF (3 falsos positivos de 232 muestras negativas), la especificidad para *E.coli* resulta ser idéntica, del 98,71%. Todos los falsos positivos son en MFC, por lo que al Tergitol 7-Chapman TTC cabe atribuirle una especificidad del 100% para *E.coli*.

MEDIO/MÉTODO	MFC-M7hFC/MF	TERGITOL/MF	MF (GLOBAL)	MCC P/A
ESPECIFICIDAD	98,71%	100,00%	98,71%	98,71%
FALSOS +	3 DE 232	0 DE 232	3 DE 232	3 DE 232

Se concluye que la especificidad para *E.coli* es excelente en los tres casos estudiados, con un óptimo en el medio Tergitol 7-Chapman TTC, seguido tanto del MFC como del método P/A. Usemos el método y medio que usemos, dentro de los aquí estudiados, para *E.coli* son de esperar muy pocos falsos positivos, por lo que nos ahorraremos numerosas confirmaciones. Por ello, este parámetro queda validado para el método P/A.

### Límite de detección, parámetro Coliformes:

Para detectar este parámetro se realizaron muestras paralelas por ambos métodos: MF con el medio más sensible (Chapman TTC-Tergitol 7 con Triptófano) y P/A mediante MCC COLICULT, inoculando cepas conocidas de diversos Coliformes (*Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens*), hasta obtener cargas de Coliformes Totales cercanas a 100 ufc/100 ml, y realizando a partir de éstas, diluciones seriadas 1/10, 1/20, 1/40, 1/60, 1/80 y 1/100, hasta conseguir muestras cuyas cargas eran de 10 ufc/1000 ml de agua (el equivalente de 1 ufc/100 ml, pero minimizando riesgos). Una vez conseguida la dilución correcta, se realizaron 10 muestras de 1000 ml (equivalentes a 100 muestras de 100 ml), a fin de obtener los resultados con una fiabilidad del 99%. Además del Tergitol 7-Chapman TTC, se duplicó el análisis P/A, realizando 10 análisis con frascos preparados P/A (MICROKIT RPL303) y otros 10 con viales de polvo irradiado (MICROKIT FPA900). Los resultados, para dicha muestra donde se consiguieron 10 ufc/litro (1 ufc/100 ml) fueron:

Muestra cuya carga esperada de Coliformes Totales fue de 10 ufc en 1000 ml (1 ufc/100 ml)	RECuento MF TERGITOL 7 CON TRIPTÓFANO (por litro)	MCC P/A preparado (10 kits RPL303, para 100 ml cada uno)	MCC P/A polvo (10 kits FPA900, para 100 ml cada uno)
Muestra 1	9 ufc/l	Presencia en 9/10 kits	Presencia en 9/10 kits
Muestra 2	7 ufc/l	Presencia en 4/10 kits	Presencia en 7/10 kits
Muestra 3	3 ufc/l	Presencia en 10/10 kits	Presencia en 9/10 kits
Muestra 4	0 ufc/l	Presencia en 8/10 kits	Presencia en 6/10 kits
Muestra 5	5 ufc/l	Presencia en 10/10 kits	Presencia en 9/10 kits
Muestra 6	4 ufc/l	Presencia en 10/10 kits	Presencia en 5/10 kits
Muestra 7	8 ufc/l	Presencia en 10/10 kits	Presencia en 9/10 kits
Muestra 8	6 ufc/l	Presencia en 10/10 kits	Presencia en 8/10 kits
Muestra 9	2 ufc/l	Presencia en 8/10 kits	Presencia en 9/10 kits
Muestra 10	9 ufc/l	Presencia en 7/10 kits	Presencia en 8/10 kits
Suma	53 ufc/l	Presencia 86/100 kits	Presencia 79/100 kits

Se consideró ufc de Coliforme en Tergitol 7-Chapman TTC, toda colonia amarilla o naranja crecida en 24-48 horas a 37°C. Se consideró presencia de Coliforme en P/A, todo frasco virado a azul turquesa en 24-48 horas a 37°C. Se demuestra así que **el método P/A para coliformes tiene un límite mínimo de detección** de 1 célula en 100 ml en el 82,5% de las muestras, **con muy superior probabilidad de acierto que la del método MF** en Tergitol-Chapman TTC, donde el límite de detección de 1 célula en 100 ml se encuentra en el 53,0% de las muestras. Dentro del método P/A, funciona algo mejor el kit preparado en medio hidratado (detección de 1 célula en 100 ml en el 86% de las muestras) que el polvo irradiado (detección de 1 célula en 100 ml en el 79% de las muestras), aunque éste sigue teniendo mucha mayor probabilidad de acierto que el método MF (detección de 1 célula en 100 ml en el 53,0% de las muestras). Para más de 10 células en 100 ml, la detección se realiza en el 99% de las muestras para el método Presencia/Ausencia y en el 98% de las muestras para el método MF en Tergitol-Chapman TTC. **Así, este parámetro queda validado para P/A.**

### Límite de detección, parámetro *E.coli*:

Para detectar este parámetro se realizaron muestras paralelas por ambos métodos: MF con el medio más específico (Chapman TTC-Tergitol 7 con Triptófano) y P/A con el MCC COLICULT, inoculando diversas cepas confirmadas de *E.coli*, hasta obtener cargas cercanas a 100 ufc/100 ml, y realizando a partir de éstas, diluciones seriadas 1/10, 1/20, 1/40, 1/60, 1/80 y 1/100, hasta conseguir muestras cuyas cargas eran de 10 ufc/1000 ml de agua (el equivalente de 1 ufc/100 ml, pero minimizando riesgos). Una vez conseguida la dilución correcta, se realizaron 10 muestras de 1000 ml (equivalentes a 100 muestras de 100 ml), a fin de obtener los resultados con una fiabilidad del 99%. Además del Tergitol 7-Chapman TTC, se duplicó el análisis P/A, realizando 10 análisis con frascos

preparados P/A (MICROKIT RPL303) y otros 10 con viales de polvo irradiado (MICROKIT FPA900). Los resultados, para la muestra donde se consiguieron 10 ufc/litro (1 ufc/100 ml) fueron:

Muestra cuya carga esperada de <i>E.coli</i> fue de 10 ufc en 1000 ml	RECuento MF TERGITOL-TRIPTÓF. (por litro)	MCC P/A preparado (10 kits RPL303, para 100 ml cada uno)	MCC P/A polvo (10 kits FPA900, para 100 ml cada uno)
Muestra 1	9 ufc/l	Presencia en 10/10 kits	Presencia en 9/10 kits
Muestra 2	8 ufc/l	Presencia en 10/10 kits	Presencia en 9/10 kits
Muestra 3	8 ufc/l	Presencia en 9/10 kits	Presencia en 8/10 kits
Muestra 4	9 ufc/l	Presencia en 10/10 kits	Presencia en 9/10 kits
Muestra 5	8 ufc/l	Presencia en 9/10 kits	Presencia en 9/10 kits
Muestra 6	11 ufc/l	Presencia en 10/10 kits	Presencia en 8/10 kits
Muestra 7	8 ufc/l	Presencia en 9/10 kits	Presencia en 9/10 kits
Muestra 8	8 ufc/l	Presencia en 8/10 kits	Presencia en 9/10 kits
Muestra 9	7 ufc/l	Presencia en 7/10 kits	Presencia en 8/10 kits
Muestra 10	10 ufc/l	Presencia en 10/10 kits	Presencia en 9/10 kits
Suma	86 ufc/l	Presencia 92/100 kits	Presencia 87/100 kits

Se consideró ufc de *E.coli* en Tergitol 7-Tryptophan Agar (MICROKIT DMT214, PPL903), toda colonia amarilla con centro naranja crecida en 24-48 horas a 37°C y que virara inmediatamente el reactivo de Kovacs, de amarillo a rojo (Indol +), directamente en la colonia. Se consideró presencia de *E.coli* en P/A, todo frasco fluorescente bajo luz UVA de 366 nm, tras 24-48 horas a 37°C, que además produjera inmediatamente anillo rojo de Indol en su superficie, tras añadirle 1 ml de reactivo de Kovacs. Se demuestra así que **el método P/A para *E.coli* tiene un límite mínimo de detección de 1 célula en 100 ml** en el 89,5% de las muestras, **con mayor probabilidad de acierto que la del método MF** en Tergitol-Chapman TTC, donde el límite de detección de 1 célula en 100 ml se encuentra en el 86,0% de las muestras. Dentro del método P/A, funciona algo mejor el kit preparado en medio hidratado (detección de 1 célula en 100 ml en el 92% de las muestras) que el polvo irradiado (detección de 1 célula en 100 ml en el 87% de las muestras), aunque éste sigue teniendo mayor probabilidad de acierto que el método MF (detección de 1 célula en 100 ml en el 86,0% de las muestras). Para más de 10 células en 100 ml, la detección se realiza en el 100% de las muestras para ambos métodos. **Por ello, este parámetro queda validado para el método P/A.**

#### CONCLUSIONES:

**1-Para Coliformes, el método P/A se coloca, en cuanto a sensibilidad (escasez de falsos negativos con respecto al total de positivos), entre los dos medios más universales del método MF: ENDO y Tergitol 7-Chapman TTC.**

**2- Para *E.coli*, el método P/A se coloca, en cuanto a sensibilidad (escasez de falsos negativos con respecto al total de positivos), en cabeza, muy por encima de los dos medios más universales del método MF: M-FC (y M7hFC) y Tergitol 7-Chapman TTC.**

**3- Para Coliformes, también en especificidad el método P/A se coloca entre los dos medios más universales del método MF: ENDO y Tergitol 7-Chapman TTC.**

**4- La especificidad para *E.coli* es excelente en los tres casos estudiados, con un óptimo en el medio Tergitol 7-Chapman TTC, seguido tanto del MFC como del método P/A.**

**5- El método P/A para coliformes tiene un límite mínimo de detección de 1 célula en 100 ml, con muy superior probabilidad de acierto que la del método MF en Tergitol-Chapman TTC.**

**6- El método P/A para *E.coli* tiene un límite mínimo de detección de 1 célula en 100 ml, con mayor probabilidad de acierto que la del método MF en Tergitol-Chapman TTC.**

**3ª fase:** Además de este estudio, invitamos a la participación de todos los laboratorios de análisis de aguas en SEILAGUA, servicio intercomparativo trimestral de microorganismos del agua coordinado por Laboratorios MICROKIT, S.L., ya que este servicio está demostrando reiteradamente que los laboratorios que utilizan el método P/A obtienen una proporción ínfima de falsos negativos, en comparación con los que usan el método de Filtración de Membrana, y ello es cierto para parámetros tan dispares como *E.coli*, Enterococos, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio cholerae* y Microalgas/Cianobacterias. En concreto, para el primer año de este servicio (otras 109 muestras de agua):

☞ En el segundo servicio, de verano de 2002, se demostró un **29% de resultados falsamente negativos por Filtración de Membrana para *Staphylococcus aureus***, frente a un **0%** mediante el método P/A.

☞ En el tercer servicio, de otoño de 2002, para *Legionella pneumophila* se obtuvo nada menos que un preocupante **83,3% de análisis falsamente negativos por el método de Filtración de Membrana**, frente a un **25%** por el método P/A; y del **100%** de análisis falsamente negativos para *Vibrio cholerae* por Filtración de Membrana, frente a un **0%** por el método Presencia/Ausencia.

☞ En el cuarto servicio, de invierno de 2002 a 2003, para *E.coli* se obtuvo el **10%** de falsos negativos por MF y el **0%** por P/A. Para Enterococos y Salmonella, el 0% de falsos negativos en ambos métodos. Para *Legionella pneumophila* se obtuvo el **100%** de falsos negativos por el método de Filtración de membrana, protocolo ISO 11731, frente a “sólo” un **20%** de falsos negativos por el método P/A MICROKIT. En este caso la *Legionella pneumophila* ATCC 33152 inoculada estaba perfectamente revitalizada, a diferencia de la muestra de otoño; y el caldo de revitalización incluido (para 4 horas previas al análisis) estaba especialmente diseñado para Legionella, a diferencia del servicio de otoño. Y a pesar de todo ello, los resultados MF de invierno son aún peores que los de otoño, y los de P/A aún mejores (sobre todo teniendo en cuenta que 2 de los 10 laboratorios que usaron el método P/A no tenían experiencia previa con este parámetro y la detectaron sin dudas). MICROKIT está estudiando un protocolo que incluya el uso de este caldo GVPC-P/A Legionella para revitalización sólo 2-4 días previos a la filtración (actualmente son 14 días), a fin de intentar disminuir esta aberrante unanimidad de falsos negativos obtenidos por MF, así como motivar el uso previo del caldo revitalizador sin retrasar tanto los resultados. Creemos de la máxima importancia que este dato sea tenido en cuenta por los expertos a la hora de definir futuros protocolos oficiales: A) CON REVITALIZACIÓN y B) SIN RECUENTO (o con recuentos cuyas tolerancias sean amplias, por ser difícil estandarizar el recuento tras un enriquecimiento).

☞ En conjunto, durante los 4 servicios del primer año SEILAGUA, con un total de 109 muestras de 8-11 parámetros microbiológicos cada una (cerca de 1.000 análisis), se obtiene casi 1 de cada 3 análisis falsamente negativos mediante el método de Filtración de Membrana, y casi 1 de cada 14 análisis falsamente negativos por el método Presencia/Ausencia, con lo que **el método P/A demuestra ser casi 5 veces más fiable que el método M.F.**

☞ En el primer servicio SEILAGUA de 2003, se corroboran los siguientes resultados:

SENSIBILIDAD	Filtración de Membrana	P/A previo a la MF
<i>Legionella pneumophila</i>	0%	100%
<i>Staphylococcus aureus</i>	23%	100%
<i>Vibrio cholerae</i>	33%	100%
Resto parámetros	SIN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS	



**LABORATORIOS  
MICROKIT, S.L.**

Apartado de Correos / P.O. Box 44  
28210-Valdemorillo (Madrid, Spain)  
F (34) 91 897 46 16 Fax: (34) 91 897 46 41  
web: [www.laboratoriosmicrokit.com](http://www.laboratoriosmicrokit.com)  
e-mail: [microkit@laboratoriosmicrokit.com](mailto:microkit@laboratoriosmicrokit.com)



ISO 9001

Madrid, 28 de Noviembre de 2002

Estimado cliente:

Nos es grato adjuntarle boceto de nuestra próxima publicación sobre la validación del método Presencia/Ausencia, método del que su laboratorio es cliente habitual.

Dado que numerosos clientes nos han pedido ayuda en su validación interna del método, para su laboratorio concreto, a causa de su próxima acreditación, les informamos que la simple **inclusión de su laboratorio como participante de este estudio intercolaborativo** será mucho más tenida en cuenta por cualquier auditor de acreditación/certificación, que la simple validación interna, para darles el visto bueno definitivo respecto a su uso, máxime teniendo en cuenta las entidades que ya han participado.

Nos consta que muchos de Uds. no disponen de aparato de filtración para comparar el mínimo de 10 muestras que estos ensayos intercolaborativos requieren. Es por ello que **también les ofrecemos nuestro aparato de filtración** de uso interno en I+D (Milliflex de Millipore), durante 1 semana y **sin coste alguno**, siempre que se comprometan a hacer uso del mismo en 10 muestras positivas y 10 negativas de Coliformes y de *E.coli*, en el plazo máximo de 1 semana, comparando con el método P/A (lógicamente, con kits de MICROKIT). Les ofrecemos también, a precio de coste, el fungible necesario, que hemos denominado "KIT VALIDACIÓN P/A" con referencia KMT007, y que no deben sentirse obligados a comprarnos a nosotros, pero que ofrecemos para su comodidad, al ser todo él material imprescindible para este estudio (parámetros sensibilidad y especificidad):

- Cepa de *E.coli* + Mix de cepas de Coliformes totales para inocular en 10 muestras naturales duplicadas de agua (cada cepa se vende habitualmente a 215,77 €).
- 20 Embudos estériles de filtración Milliflex para medio sólido, para las 20 muestras (10 positivos y 10 negativos).
- 20 Placas con membrana para uso con dichos embudos.
- Medio de cultivo preparados para Coliformes + *E.coli* (2 frascos 100 ml Tergitol 7 Agar para fundir en agua hirviendo y elaborar las 20 placas, de 10 ml cada placa).
- 2 cajas MCC-COLICULT con 10 frascos preparados (GRATIS por el pedido del resto).
- 1 Reactivo Indol Kovacs para confirmación de *E.coli*
- TOTAL COSTE KIT VALIDACIÓN P/A: 385,44 €+ IVA

Por todo ello, vamos a paralizar durante 2 meses dicha publicación, a fin de darles a todos Uds. la oportunidad de participar en ella. Rogamos que si están interesados, se pongan urgentemente en contacto con nuestro Director Técnico y Gestor de la Calidad, D.Jorge Sanchís Solera, para consensuar el depósito del aparato de filtración, agilizar el pedido del fungible necesario (KMT007, si lo desean) y explicarles con detalle el protocolo de trabajo.

Esperando sepan apreciar nuestros esfuerzos, aprovechamos para saludarles, como siempre, muy atentamente

Covadonga Estévez Sarabia



**LABORATORIOS  
MICROKIT, S.L.**

Apartado de Correos / P.O. Box 44  
28210-Valdemorillo (Madrid, Spain)  
F (34) 91 897 46 16 Fax: (34) 91 897 46 41  
web: [www.laboratoriosmicrokit.com](http://www.laboratoriosmicrokit.com)  
e-mail: [microkit@laboratoriosmicrokit.com](mailto:microkit@laboratoriosmicrokit.com)



ISO 9001

## PROTOCOLO DE VALIDACIÓN MÉTODO PRESENCIA/AUSENCIA

Los clientes de MICROKIT interesados en participar en la próxima publicación interlaboratorio sobre el tema, para que su laboratorio valide el método en comparación con el de filtración de membrana, en los 3 parámetros: “sensibilidad, especificidad y eficiencia”, deberán seguir los siguientes pasos:

- 1- Pedir al menos 1 kit de validación P/A ref. MICROKIT KMT007 para 10 muestras positivas más 10 muestras negativas (total 20 muestras)
- 2- “Pedir vez” en el préstamo del aparato de filtración (si no tienen en su laboratorio)
- 3- Seguir el protocolo de trabajo que se adjunta más abajo
- 4- Ser conscientes de que el plazo de presentación de resultados comparativos finaliza el 24 de Febrero de 2003, si desean ser incluidos en la publicación que se derivará, ya que para entonces se tendrán los resultados comparativos de todos los microorganismos del servicio intercomparativo SEILAGUA, que se incluirán también en esta publicación.
- 5- Conocer que el cuarto parámetro de validación, “límite de detección”, necesita de 100 muestras comparativas (total 200) y de una rigurosa precisión en el cálculo de ufc en la muestra, por lo que no ofrecemos su participación. Este parámetro ha sido validado en las instalaciones de MICROKIT y aparecerá en la publicación tal y como aparece en la segunda galerada de dicha publicación, que adjuntamos.
- 6- Dar su autorización escrita (firma y sello) si desean aparecer en la publicación con nombres de personas y empresas. En caso contrario aparecerán como “anónimo”:

Autorizo a Laboratorios MICROKIT a que el nombre de las siguientes personas y/o empresa aparezca en la publicación definitiva sobre la validación del método P/A en España:

Personas: .....

Empresa y localidad: .....

Firma de la persona responsable en dicho laboratorio y sello de la empresa:

Enviar copia firmada y sellada a MICROKIT, fax 91-897 46 41



### Protocolo de validación método P/A

1-Verter el mix bacteriano, compuesto por un cócktel de *E.coli* y por varias especies de los géneros de coliformes: *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. y *Serratia* spp., en 2 litros de agua del grifo tratada con Tiosulfato sódico en un recipiente único. Tras recibir el mix bacteriano debe conservarse en refrigeración 4-8°C un máximo de 1 semana (-1 mes).

2-Agitar volteando al menos 10 veces para homogeneizar la muestra positiva.

3-Añadir 100 ml a cada uno de 10 de los kits preparados MCC P/A (muestras 1 a 10, inoculadas, P/A)

4-Filtrar 100 ml en cada uno de 10 de los embudos estériles y depositar el filtro sobre una placa preparada de Tergitol Agar-Chapman TTC (muestras 1b a 10b, inoculadas, MF)

5- Repetir los pasos 3 y 4 con agua exenta de coliformes y de *E.coli*, con los otros 10 kits MCC P/A (muestras 11 a 20, sin inocular, P/A) y con los otros 10 embudos estériles (muestras 11b a 20b, sin inocular, MF)

6-Incubar los 40 test juntos a 35-37°C, 24-48 horas

7-Registrar los resultados (+ si aparecen ó - si no) en una tabla como la que sigue:

Método	P/A		MF	
	Coliformes	<i>E.coli</i>	Coliformes	<i>E.coli</i>
Muestra 1/1b				
Muestra 2/2b				
Muestra 3/3b				
Muestra 4/4b				
Muestra 5/5b				
Muestra 6/6b				
Muestra 7/7b				
Muestra 8/8b				
Muestra 9/9b				
Muestra 10/10b				
Muestra 11/11b				
Muestra 12/12b				
Muestra 13/13b				
Muestra 14/14b				
Muestra 15/15b				
Muestra 16/16b				
Muestra 17/17b				
Muestra 18/18b				
Muestra 19/19b				
Muestra 20/20b				

Indicar en cada casilla los resultados obtenidos, sólo con un signo + ó -. Se consideran con coliformes (+) en P/A, las muestras que viran a azul; y en MF las que tienen alguna colonia naranja o roja. Se consideran con *E.coli* (+) en P/A, las muestras que emiten fluorescencia azul (como la tónica en las discotecas), en la oscuridad, cuando se iluminan con luz ultravioleta de 366 nm (linterna MICROKIT VMT050), y DESPUES reaccionan positivo en Indol (anillo rojo en superficie tras 1 minuto de añadir 1 ml de reactivo de Kovacs MICROKIT SBH056); y en MF, las colonias naranjas con centro amarillo, que producen viraje a rosa del mismo reactivo, amarillo, al añadir 1 gota sobre la colonia sospechosa (Atención, esta reacción sólo es directa en colonias de *E.coli* crecidas en Tergitol Agar-Chapman TTC de la marca MICROKIT; para el resto de marcas, tomar la colonia, incubarla en 9 ml de Agua de Triptona, 24 h

a 35-37°C, y añadir entonces la gota de reactivo de Kovacs, considerando positivo el tubo que produzca anillo rojo en superficie tras 1 minuto).

8-Anotar el número de falsos positivos (muestras 11 a 20 que den positivo) y el de falsos negativos (muestras 1 a 10 que den negativo) obtenidos de cada uno de los dos métodos, para ambos parámetros (Coliformes y *E.coli*) en dos tablas como las que siguen:

Coliformes

Método	P/A	MF
Falsos negativos		
Sensibilidad	%	%
Falsos positivos		
Especificidad	%	%
Eficiencia	%	%

*E.coli*

Método	P/A	MF
Falsos negativos		
Sensibilidad	%	%
Falsos positivos		
Especificidad	%	%
Eficiencia	%	%

Calcular la Sensibilidad como el número de positivos obtenidos (10 menos el número de falsos negativos) dividido por el número de positivos reales (que son 10), todo ello expresado en porcentajes. Calcular la Especificidad como el número de negativos obtenidos (10 menos el número de falsos positivos) dividido por el número de negativos reales (que son 10), todo ello expresado en porcentajes. Calcular y registrar la Eficiencia como el número de positivos reales más el número de negativos reales obtenidos (20 menos el número de falsos negativos y menos el número de falsos positivos), todo ello dividido por el número total de muestras (que son 20), y expresado en porcentajes.

9-Considerar validado el método P/A, con un 95% de acierto estadístico (al ser 20 las muestras comparadas, entre positivos y negativos), si su sensibilidad, su especificidad y su consecuente eficiencia, son iguales o superiores a las del método MF. Si alguno de estos tres parámetros es inferior en P/A que en MF, habría que repetir el experimento porque muy probablemente, algo se ha hecho mal (en comparación con las 451 muestras de los otros laboratorios que sí lo han validado).



**LABORATORIOS  
MICROKIT, S.L.**

Apartado de Correos / P.O. Box 44  
28210-Valdemorillo (Madrid, Spain)  
F (34) 91 897 46 16 Fax: (34) 91 897 46 41  
web: [www.laboratoriosmicrokit.com](http://www.laboratoriosmicrokit.com)  
e-mail: [microkit@laboratoriosmicrokit.com](mailto:microkit@laboratoriosmicrokit.com)



ISO 9001

Madrid, 20 de Enero de 2003

Sanidad Exterior-Administración Central  
Subdirector General de Sanidad  
Ambiental y Salud Laboral  
Paseo del Prado, 18-20  
28014-Madrid

Excmo. Sr:

Adjuntamos boceto preliminar del **estudio intercolaborativo** que con fecha inminente (24 de Febrero de este año) daremos por concluido, y que publicaremos a partir de dicho momento en una revista de alcance al laboratorio nacional.

Nos permitimos remitírselo dada la importancia que imaginamos podría suponer a la hora de aceptar el método microbiológico de Presencia/Ausencia en la Normativa de trasposición de la Directiva Europea de Aguas de Consumo Humano, dado que **en él han participado más de 40 laboratorios de nuestro país** desde el año 1997 hasta la actualidad, si bien muchos de ellos deben permanecer anónimos por su propia petición o por el hecho de participar en un servicio intercomparativo que es de carácter confidencial (SEILAGUA de MICROKIT).

Creemos que la marca comercial no es lo importante, aunque todo el estudio se haya realizado con los kits P/A de MICROKIT, diseñados hace ya casi una década; lo importante es que el método P/A demuestra ser, al menos, tan sensible, específico y eficiente (o más) que el de Filtración de Membrana, y para todos los parámetros microbiológicos estudiados, incluidos *E.coli*, Enterococos, *Clostridium perfringens* y hasta *Legionella pneumophila*, entre muchos otros.

Ello implicaría la viabilidad de numerosos autoanálisis, que en la actualidad se desarrollan sin seguir normativa pero, sobre todo, el tremendo **aumento de la capacidad para hacer más análisis** por parte de los laboratorios que ya los hacen y **el aumento del número de laboratorios que podrían realizarlos** y que ahora no pueden (sobre todo, de la industria alimentaria y numerosos Ayuntamientos de localidades pequeñas, sin experiencia en la analítica de microbiología de aguas).

El 24 de Febrero les enviaremos el borrador definitivo, que incluirá los resultados del último servicio intercomparativo SEILAGUA de esta firma comercial.

Esperando contribuir, desde nuestra modesta colaboración, en la mejora de la capacidad analítica de la microbiología de las aguas, aprovechamos para saludarles, como siempre,

Atentamente

Jorge Sanchís Solera  
Coordinador del estudio  
Biólogo



**LABORATORIOS  
MICROKIT, S.L.**

Apartado de Correos / P.O. Box 44  
28210-Valdemorillo (Madrid, Spain)  
F (34) 91 897 46 16 Fax: (34) 91 897 46 41  
web: [www.laboratoriosmicrokit.com](http://www.laboratoriosmicrokit.com)  
e-mail: [microkit@laboratoriosmicrokit.com](mailto:microkit@laboratoriosmicrokit.com)



Madrid, 20 de Febrero de 2003

Sanidad Exterior-Administración Central  
Director General de Sanidad Ambiental  
y Salud Laboral: Dr.Francisco Vargas  
Paseo del Prado, 18-20  
28014-Madrid

Excmo. Sr:

Tras un mes exacto de nuestra ultima carta (ver reverso), en la que les hacíamos partícipes del boceto preliminar del **estudio intercolaborativo** que damos ahora por concluido, y que vamos a publicar en una revista de alcance al laboratorio nacional, nos es grato adjuntar el proyecto definitivo, que incluye los ultimos resultados del estudio intercomparativo de microbiología de aguas SEILAGUA.

Nos permitimos remitírselo dada la importancia que imaginamos podría suponer a la hora de aceptar el método microbiológico de Presencia/Ausencia y/o el método de **pre-enriquecimiento revitalizador** (ambos con nuestro caldo GVPC modificado), tambien en el caso de *Legionella pneumophila*, en la futura Normativa de detección de este patógeno en muestras ambientales. A la vista de los resultados intercomparativos sobre 30 clientes confidenciales en España, donde la Legionella se ha detectado como **falsamente negativa en una proporción abrumadora de muestras analizadas por el método ISO 11731**, más o menos modificado, proponemos nuestro método previo de tratamiento de la muestra.

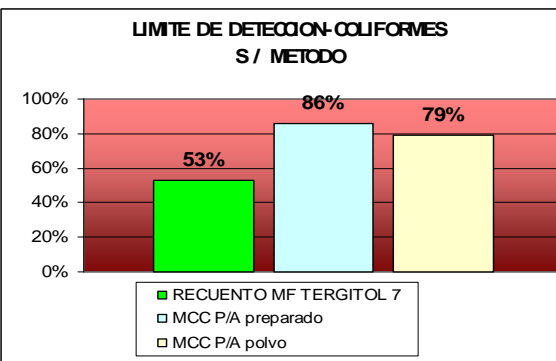
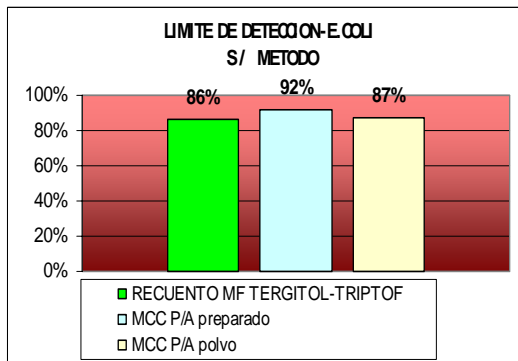
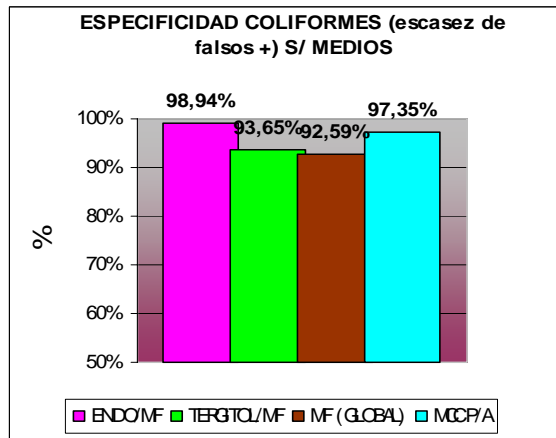
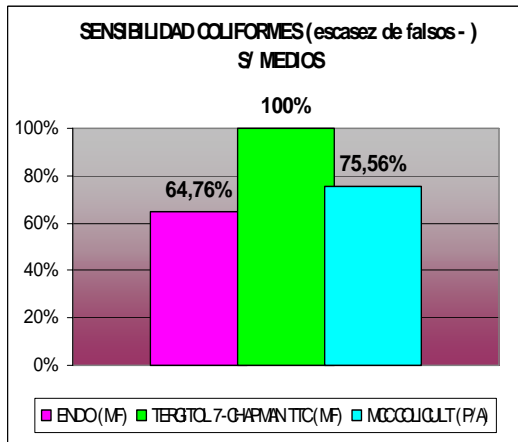
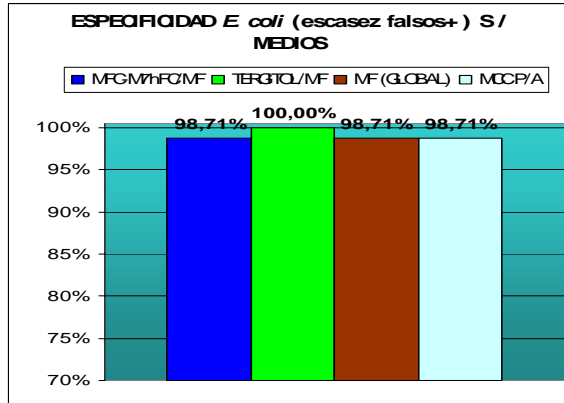
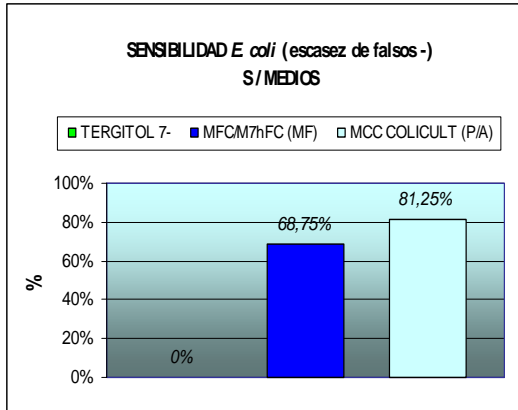
Estamos convencidos de que ello implicaría un impactante aumento de la sensibilidad en la detección de las, hoy afortunadamente estresadas, legionellas en las muestras de campo.

Esperando contribuir, desde nuestra modesta colaboración, en la mejora de la capacidad analítica de la microbiología de las aguas, aprovechamos para saludarles, como siempre,

Muy atentamente

Jorge Sanchís Solera  
Coordinador del estudio  
Biólogo

GRÁFICAS VALIDACIÓN MÉTODO P/A



**SENSIBILIDAD (escasez falsos-) métodos según Servicio Intercomparativo de Aguas (Seilagua) AÑO 2002**

