

CERTIFICADO DE VALIDACIÓN MÉTODO RÁPIDO ENTEROCOCOS EN AGUAS ENVASADAS (BEA ISO 7899-2)



Certificamos que el método y productos:

Método rápido de Enterococos con BEA de MICROKIT

(medio Bilis Esculina Azida Agar BEA -uso directo DMT160, PPL915, ECOPQ01-), cumplen con los estándares de VALIDACIÓN en base a la Norma UNE-EN-ISO 16140:2003, cuyos resultados se anexan. La validación ha sido realizada mediante comparación por el método de pares, frente a los métodos oficiales de referencia: ISO 11133 de control de calidad de medios de cultivo, ISO 7899 de Enterococos fecales en aguas, Real Decreto 140-2003 de aguas de consumo humano, Real Decreto 314/2016 de aguas envasadas, Directiva UE 7.10.2015 de aguas de consumo humano y con cepas cuantitativas de referencia diana, interferentes y acompañantes. Las validaciones de MICROKIT son inspeccionadas y certificadas en el alcance por terceros (SGS en sus auditorías ISO 9001), tal y como establece el reglamento CE 2073/2005.

Esta validación interna e intercomparativa queda elevada a intercolaborativa al hacerse en colaboración con un laboratorio externo que ha participado en la misma, en sus instalaciones, en muestras naturales de aguas envasadas de las que analiza rutinariamente, comparando los resultados del método estándar (placas SB y BEA) con el uso directo de BEA-18 horas y consecuente ahorro de 24-48 horas y del medio SB.

El presente certificado sólo es válido durante el periodo de vigencia de los métodos citados y aunque se garantiza periódicamente, mediante revalidación intercomparativa (para todo tipo de aguas), habrá de ser renovado siempre que haya cambios de diseño del medio BEA (ej: marca, actualizaciones...) o del procedimiento, que puedan afectar significativamente los resultados.

Este certificado autoriza a todo usuario del método validado, a respaldarse en los estudios de validación de MICROKIT si Sanidad le exige la validación interna de su método en concreto con sus propias matrices, equipos, analistas y sus instalaciones, siempre que se empleen los métodos, matrices y medio de cultivo MICROKIT referenciados y amparados en este certificado.

Garantizado por:


Jorge Sançhis Solera

Coordinador Intercomparativos SEILA y Director de Calidad MICROKIT®

A fecha: 3-Diciembre-2021

Actualizado a fecha: 04/03/2021

**INFORME DE VALIDACIÓN CUANTITATIVA DETECCIÓN Y
RECuento DE *Enterococos fecales* POR MÉTODO RÁPIDO DIRECTO (BEA
18 horas EN BASE ISO 7899-2) EN LABORATORIOS DE AGUAS ENVASADAS**

INDICE:

1-Objetivos

2-Alcance

3-Parámetrto microbiológico a validar

4-Diseño del experimento

5-Herramientas utilizadas

6-Procedimiento

7-Resultados

8-Estudio estadístico de los datos (Límites de cuantificación o rango, Exactitud, Precisión, Linealidad, Selectividad inclusiva, Especificidad exclusiva, Robustez del parámetro, Incertidumbre de las medidas)

9- Conclusiones, calificación final de la validación según el resultado estadístico y decisión

10-Bibliografía

11-Anexos: fotografías de la validación y certificados de análisis de las herramientas empleadas

**12-Validación realizada por MICROKIT en Laboratorio privado voluntario de Aguas envasadas,
Fechas y Firmas**

1. Objetivos

El método estándar de recuento de Enterococos fecales ISO 7899-2 tiene un grave problema: tarda un mínimo de 48-72 horas en proporcionar resultados fiables, porque intercala entre la filtración de la muestra y el medio selectivo (Bilis Esculina Azida Agar, BEA), otro medio que no lo es (Slanetz Bartley Agar, SB). Este error ya lo subsanaron para *E.coli* los Reales Decretos 140-2003, 314-2016 y 902-2018, cambiando del medio no selectivo Tergitol TTC, por el uso directo del medio selectivo CCA (MugPlus). Pero como hay que esperar la ausencia de todos los patógenos/indicadores para poder liberar los lotes, la actualización oficial de métodos en un solo parámetro no ha resuelto el problema. Ninguna industria puede tener paralizado el stock de 3 días de producción durante décadas, a causa de anacronías legislativas, cuando existen otros métodos fiables que detectan y enumeran adecuadamente en las muestras de agua y acabarán siendo Norma ISO, como sucedió con el medio selectivo de *E.coli* (pero hubo que esperar nada menos que 18 años tras su creación y a pesar de dejar fascinados, por su mayor fiabilidad, a todos sus usuarios en cuanto lo conocieron y probaron). Nos proponemos demostrar, como sabemos ya han hecho otras embotelladoras y otras plantas de tratamiento de aguas potables, que el método directo en medio selectivo de Enterococos fecales BEA, funciona tan bien, si no mejor, que el método estándar. Es decir, comprobar que la técnica directa, los medios de cultivo utilizados de la marca MICROKIT y los analistas que intervienen en el control rutinario de recuento de Enterococos fecales, son idóneos, con resultados aptos y fiables, y determinar la exactitud (cercanía a la realidad) y precisión (variaciones entre réplicas y duplicados) del método directo respecto al método estándar en los rangos de trabajo necesarios, así como la linealidad y el carácter inclusivo (selectividad) y exclusivo (especificidad) del método cuantitativo rápido con respecto al estándar.

2. Alcance

Las muestras de agua envasadas en nuestras plantas. Aguas tomadas tal cual, sin esterilizar, para dejarles su flora natural interferente o acompañante, pero a las que añadimos microorganismos diana, y otros interferentes y acompañantes bien elegidos, para que los controles de la validación tengan la máxima utilidad.

3. Parámetro microbiológico a validar

El parámetro objeto de la presente validación es el recuento de las bacterias denominadas *Enterococos fecales*. De todas formas el concepto que las separa de los *Streptococos fecales* es ortodoxo y fuera de lugar, ya que éstos sanitariamente tienen el mismo origen (aguas fecales de animales –aves y mamíferos, incluso más probables dada la ubicación de las envasadoras de agua- en vez de humanas) que tampoco son tolerables en un agua envasada o de consumo humano. De ahí la importancia de contrastar con medios que son clásicos para ambos grupos, como el uso directo de Bilis Esculina Azida Agar sin paso previo por Slanetz Bartley Agar, lo cual nos ahorra 2 días a la hora de tomar decisiones, que son 2 de los 3 días de stock de producto terminado, con el inmenso coste y espacio que eso supone.

4. Diseño del experimento

Realizaremos en un número de botellas de 30 muestras de 1 L, obteniendo 4 análisis por muestra:

- 1- Con el protocolo y medio de cultivo habitual (M-Enterococcus Slanetz-Bartley SB 48h + confirmación por traspaso de la membrana en Agar Bilis-esculina BEA 4-24h),
- 2- Con el medio selectivo rápido (Bilis-Esculina-Azida BEA 18h en vez de 48h): el método rápido o directo que proponemos y ya ha sido validado con excelencia en otras empresas de aguas
- 3- Sus sendos duplicados idénticos (o bien réplicas similares) para el estudio de la precisión

No hemos añadido el medio estándar USA de la agencia de medio ambiente, el EPA, cromogénico y por tanto enzimático, porque a pesar de que en otras validaciones mejora aún más los resultados del BEA, preferimos no apartarnos de la Norma ISO 7899.

El que pretendemos validar, se trata de un método rápido (18 h) basado en la Norma ISO 7899, incluso con el medio normativo selectivo (BEA), pero optimizada sin redundancias.

El número de muestras para la validación se ha elegido 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 si son menos de 1000, un número de 10 sería adecuado (aunque también 30 muestras -10 muestras triplicadas- será más adecuado para poder estudiar en el primer triplete 10 negativos duplicados, en el segundo triplete 10 positivos duplicados y en el tercer triplete 10 positivos en el rango bajo duplicados, el que más afecta a este tipo de muestras y que además nos sirve para encontrar el límite inferior de cuantificación que seremos capaces de demostrar a pesar de la inmensa incertidumbre microbiológica).

Dado que las muestras son de 250 mL y tenemos dos métodos a comparar (el rápido y el estándar), si inoculamos las cepas en 1 L de cada botella (30 botellas), podremos de la misma muestra hacer 4 réplicas: 2 de un método y 2 del otro, de modo que a su vez estudiaremos en cada botella la precisión que conseguimos tras prolongada y potente agitación, en el duplicado de filtraciones y placas. Como las botellas son de 1,5 L, eliminamos 500 mL de cada botella para dejar 1 L (y 500 mL de cámara de aire). De modo que con 30 botellas obtenemos 120 placas, 60 del método estándar y 60 del método rápido.

Somos conscientes de que en vez de con placas duplicadas es mejor trabajar con placas triplicadas, pero consideramos suficiente en la validación haber hecho cuadruplicados porque en realidad, al usar los 2 métodos en 30 muestras, por duplicado cada uno, el número de placas ya se dispara a 120, lo que nos tiene ocupados una jornada de trabajo entera.

La **exactitud** se calculará en cada uno de los dos métodos como % de recuperación de colonias diana respecto al valor inóculo que habremos calculado a partir de las cepas inoculadas y corregido según el crecimiento que haya en los “negros” (placas inoculadas directamente con las diluciones calculadas de las cepas, sin pasar por su dilución en el 1L de agua, seguida del método de filtración). En cada rango de recuento en placa (bajo, medio y alto, intentando conseguir un mayor énfasis en el bajo).

La **precisión** se calculará como coeficiente de variación (CV%) de la desviación estándar dividida por la media obtenida. En cada rango de recuento en placa. Será una precisión doble: duplicados de 2 placas del mismo método por botella e intermétodos de, a su vez, 2 placas de diferentes medios (4 placas por muestra de 1 L). La componente más potente de esta precisión será la **repetitividad**. Si se desea realizar estudio de la **reproducibilidad**, deben inocularse y analizarse otras tantas muestras otro día con réplicas que deben ser idénticas a las primeras, y analizadas por otro analista. Dada la escasa información adicional que da este tema, según hemos visto en intercomparación, y lo costoso que resulta repetir la validación, nos conformamos con la componente repetitividad de la precisión.

La **linealidad** se establecerá mediante una gráfica que refleje cómo al aumentar el número de ufc de cepas diana inoculadas, aumenta linealmente el número de colonias típicas obtenidas en placa. Para ello necesitaremos los 3 rangos de recuento en placa (bajo, medio y alto).

El carácter **inclusivo** (selectividad, escasez de falsos negativos) y **exclusivo** (especificidad, escasez de falsos positivos) del método cuantitativo, lo demostraremos gracias al inóculo de al menos dos dianas diferentes en el primer caso y de los interferentes en el segundo, (además de las cepas acompañantes). La elección de las cepas interferentes se hará de acuerdo con 32 años de experiencia previa sobre las cepas que mejor crezcan en los medios empleados y sean capaces de generar falsos positivos. La elección de las cepas acompañantes será acorde a cepas salvajes aisladas de muestras naturales similares, siempre que se hayan caracterizado genéticamente, a ser posible un Gram positivo y un Gram negativo y de forma ideal, un Gram positivo, un Gram negativo oxidasa positivo y un Gram negativo oxidasa negativo. Aunque las muestras ya lleven sus acompañantes habituales.

La **incertidumbre** de las mediciones se calculará de acuerdo a los estándares internacionales actuales, aún siendo conscientes de que hay demasiadas premisas o componentes de la incertidumbre microbiológica que no se están teniendo en cuenta en dichos estándares, por lo que para nosotros, este dato no tiene ningún valor. En realidad la incertidumbre microbiológica es infinita, por lo que es perder el tiempo intentar calcularla como si las células microbianas fuesen analitos químicos que se diluyen con una homogeneidad perfecta.

Haremos “negros” de cepas sin muestra, directamente inoculadas en placas (sin pasar por el método), para verificar si la concentración actual 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, aplicando el factor de corrección que se detecte). Esto es muy habitual, una cepa cuantitativa muy raramente da un valor similar en el laboratorio al que llega, que el que tenía en el laboratorio del fabricante cuando salió de allí. Estas muestras negras no es necesario que sean 20, podemos hacer una para cada cepa, en los medios de cultivo de la validación y/o los del certificado del proveedor, y si queremos en el medio general (TSA para bacterias o SDA para hongos); estas placas sí que debemos realizarlas en duplicados o triplicados, a fin de obtener la desviación estándar además de la media y ser conscientes que la enorme incertidumbre microbiológica no depende sólo del método, ya que veremos placas duplicadas muy diferentes sin necesidad de que los microorganismos hayan sido diluidos en el agua y luego filtrados e inoculada la membrana en la placa de medio de cultivo. Estos negros se suelen inocular en el rango

medio de recuento en placa por ser el que menos imprecisión tiene en microbiología, ya que en este caso se trata de obtener los valores lo más reales posible. Pero como en nuestras matrices la aparición de alguna colonia ocasional suele darse en el rango bajo, lo podemos hacer en éste. Estos negros es mejor hacerlos en placa de 90 mm para repartir bien con asa Digrafsky, ya que en anteriores validaciones al hacerlo en placas de 55 mm el reparto salía muy heterogéneo.

Partimos de la base que en ninguna muestra estaba presente en origen el microorganismo diana, ya que de lo contrario se nos iría al traste toda la validación por “falsos positivos”; para evitarlo en general se suelen analizar todas las muestras antes de la validación y se recuperan, o bien, al ser agua, simplemente se suelen autoclavar previamente, ya que esta esterilización no le cambia las propiedades físico-químicas ni organolépticas. Si se tratase de aguas cloradas no necesitaríamos hacer nada más que almacenarlas en botes durante 48 horas, ya que *los Enterococos fecales* quedan inhibidos por el cloro; y este es el caso ideal, ya que conservarían parte de la flora acompañante (quizá incluso interferente), que aun así nos encargaríamos de inocular. Lo que hacemos en realidad es suponer que no haya positivos en las muestras, ya que son muestras de rutina que nunca suelen dar positivo y no queremos que desaparezca la flora acompañante o interferente natural. Muestras que serían decloradas en botes con Tiosulfato Na si se tratase de aguas de consumo, en vez de naturales/minerales envasadas.

Las matrices, si son variables, se eligen de acuerdo con dos criterios enfrentados: La mitad que sean las que más problemas microbiológicos o inhibitorios suelen dar; la otra mitad, que sean las más habituales. Consideraríamos necesario realizar en validación aparte, los tipos de aguas cuyo recuento esperable de *Enterococos fecales* fuese elevado (como las residuales y vertidos, aguas naturales de ríos o playas...), dejando esta validación actual para las de recuentos bajos o cero: aguas de consumo humano, aguas de bebida envasadas, aguas de baño cloradas, aguas de fabricación de alimentos...

Previamente habremos inoculado en nuestras propias matrices, varias cepas de referencia (cuantitativas, de reserva, trazables, con indicación de su precisión inicial), siguiendo el método que queremos validar, así dopado con estos “patrones” (cepas de referencia), lo que nos permitirá conocer el valor esperable, para así compararlo con el valor obtenido 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. Se emplean las cepas que indica la ISO 11133-2 y estén disponibles en el mercado como cuantitativas de recuento alto, así como otras interferentes y acompañantes que, según la experiencia del asesor de MICROKIT, suelen dar más posibilidades de falso positivo en los medios empleados. Y no sólo cepas de colección, también se intentará añadir cepas nativas o salvajes.

Se calculan cuántos ml y de qué concentración del banco de diluciones se debe partir para obtener finalmente en la placa de recuento, aproximadamente el número de colonias deseadas en los rangos bajo, medio y alto estándar en plaquita de 55 mm. (por ejemplo: 0, 3-15, 16-50 y 51-90 y 91-150 ufc). Si los microorganismos diana formasen colonias muy pequeñas (ej: enterococos) el rango máximo podría subir incluso a 200 y hasta 300 ufc; si formasen colonias muy grandes (ej. Clostridios, Pseudomonas...)

debería bajar el rango más alto incluso a 50 (se acepta como norma general que como máximo la superficie de las colonias sume 1/3 de la superficie de la placa).

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

Este paso es el más lento de toda la validación y ya se lleva calculado a la misma, tras repasar los cálculos hasta confirmar que no haya errores, ya que de haberlos todos los resultados saldrían mal y no sería la primera vez que hay que repetir el experimento tras perder un día entero de trabajo.

No tiene sentido en una validación realizar diluciones seriadas (incluso si se hacen en los análisis rutinarios), ya que si el valor diana en la muestra es por ejemplo 25, 50 y 100 col/placa, ya en la primera dilución se saldría por debajo del rango de recuento en placa (15 col/placa).

O bien aplicamos la regla de tres simple para ver cuántos μl de inóculo necesitaremos por cada muestra y cuantos ml de inóculo necesitaremos para el total de muestras. Por ejemplo, si tenemos *Enterococos fecales* a concentración $1,84 \times 10^6$ ufc/lentícula, al añadir esa lentícula en 10 ml de Ringer, la concentración de este primer tubo (dilución 0) será de $1,84 \times 10^5$ ufc/ml. Haciendo una primera dilución del tubo madre en 9 ml de Ringer, obtendremos $1,84 \times 10^4$ ufc/ml, en una segunda dilución obtendremos $1,84 \times 10^3$ ufc/ml, en la tercera $1,84 \times 10^2$ ufc/ml, y en la cuarta $1,84 \times 10^1$ ufc/ml que necesitamos inocular en cada muestra positiva (18 ufc/muestra de 250 ml para obtener 18 colonias/placa, que ya es un valor muy cercano al de 15 col/placa arriba comentado y lo dejaríamos así porque de este modo no haría falta jugar con números extraños de μl). En el ejemplo, si vamos a necesitar inocular 1 ml de esta dilución -4 (o mejor 0,1 ml de la dilución -3) en 5 de las 30 muestras de cada uno de los 4 métodos, necesitaremos un total de 20 ml (o bien 2 ml de la dilución -3) es decir, al menos 2 tubos Ringer 10 ml de la dilución -4 de esta dilución, y sólo para este rango. Sumando los demás rangos (por ejemplo, 0,2 ml de la -3 para obtener 36 colonias/placa, en otras 4 de las 20 muestras; y 0,4 ml de la -3 para obtener 72 colonias/placa en otras 4 de las 20 muestras; y 0,8 ml de la -3 para obtener 144 colonias/placa en otras 4 de las 20 placas; las otras placas sin diana para control de la especificidad exclusiva) obtendremos la cantidad de inóculo (n° de tubos Ringer) que necesitaremos para cada uno de los 4 métodos (multiplicar por 4 la cantidad obtenida). Y así con todas las cepas diana, interferentes y acompañantes. Los cálculos exactos de esta validación quedan reflejados más adelante, y en las tablas de cálculos y resultados.

Cuidamos que los inóculos estén siempre entre 100 y 1000 μl para disminuir la incertidumbre de los mismos, y para ello elegimos el tubo de dilución más adecuado.

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 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 algunos o todos los acompañantes) y en otras sólo uno de los

acompañantes (y algunos o todos los interferentes). Dada la complicación de esta opción para leer los resultados, preferimos dejar la mayoría de las muestras con interferentes, sólo para las muestras sin diana (las muestras negativas).

El experimento se inicia el día 29 de Noviembre de 2021, los resultados se leen en 18h (el 30 de Noviembre a primera hora de la mañana) para el método rápido y el 1 de Diciembre por la tarde para el método estándar, y el informe se acaba de redactar, el día 3 de Diciembre de 2021.

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
- Agitador Vórtex
- Autoclave
- Estufa a 37°C ± 1°C (no hace falta, en muestras tan limpias, la Tª selectiva de 44,5°C)
- Nevera
- Probetas
- Botellas de 1,5 L
- Asas de Digrasky de plástico estériles
- Asas de siembra plástico de 100 µl
- Alcohol de 70º, toallitas desinfectantes, gel hidroalcohólico
- Filtros de membrana de ésteres de celulosa (han sido de marca Millipore)
- Embudos estériles
- 2 Rampas de filtración de 3 embudos cada una
- Soportes de filtración
- 2 Bombas de vacío
- Pinzas estériles
- Mechero bunsen, mecheros de alcohol
- Contador de colonias

5.2 Medios y diluyentes a utilizar

Medios y diluyentes MICROKIT	Lote y caducidad
Solución salina marina 0,9% tubos 10 ml para disolver las cepas	Lote: 2110/3819-6; Caducidad: 04/10/2023
Solución salina marina 0,9% tubos 9 ml para diluciones decimales de las cepas	Lote: 2111/3837-6; Caducidad: 18/11/2023
Plaquis® herméticas SLANETZ BARTLEY TTC AGAR m-Enterococcus (SB)	Lote: 2111/3837-6; Caducidad: 11/05/2022
Plaquis® herméticas BILE ESCULIN AZIDE AGAR (BEA)	Lote: 2111/3837-6; Caducidad: 18/05/2022
M-Ident Catalasa gotero 5 mL	Lote: 2111/23833-6; Caducidad: 10/05/2022

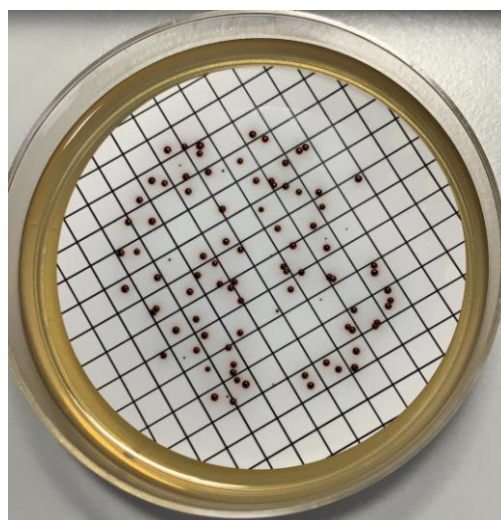
Composición de los medios empleados (en g/L):

Solución salina marina:

Cloruro sódico	24,534 g
Cloruro de magnesio	11,112 g
Sulfato sódico	4,094 g
Cloruro de calcio	1,159 g
Cloruro de potasio	0,694 g
Bicarbonato sódico	0,201 g
Bromuro potásico	0,100 g
Cloruro de estroncio	0,042 g
Acido bórico	0,027 g
Fluoruro de sodio	0,003 g
Otros oligoelementos	c.s.

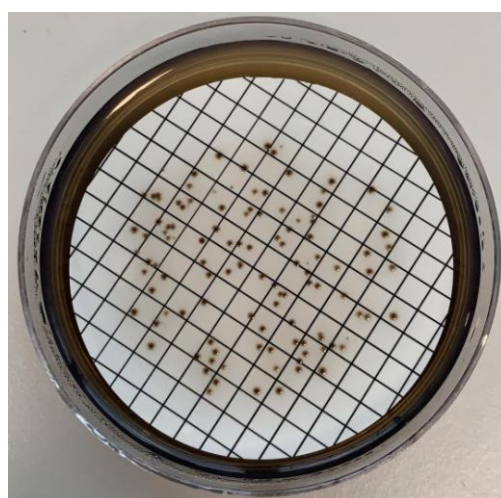
SLANETZ BARTLEY TTC AGAR:

Triptona Microkit	20,00 g
Extracto de levadura Microkit	5,00 g
Glucosa	2,00 g
Fosfato dipotásico	4,00 g
Azida sódica	0,40 g
TTC	0,10 g
Agar-agar E Microkit (100% <i>Gelidium sesquipedale</i> Mar Cantábrico)	12,00 g



BILE ESCULIN AZIDE AGAR:

Bilis de buey Microkit	10,00 g
Peptona Microkit	3,00 g
Triptona Microkit	17,00 g
Extracto levadura Microkit	5,00 g
Cloruro sódico	5,00 g
Esculina	1,00 g
Citrato férrico-amónico	0,50 g
Azida sódica	0,15 g
Agar-agar E Microkit (100% <i>Gelidium sesquipedale</i> Mar Cantábrico)	15,00 g



5.3 Material biológico utilizado

Suspensiones de cepas cuantitativas de referencia, trazables, con indicación de su precisión inicial a partir de las cuales se prepara el inóculo. Incluimos dianas, interferentes y acompañantes. Se trata de

seguir la ISO 11133-2 en la elección de cepas, aunque no siempre es posible encontrar cepas cuantitativas y estabilizadas de las allí sugeridas, y se añaden otras que a experiencia del asesor, son más interesantes por provocar falsos positivos. Y, si es posible, añadimos cepas nativas (salvajes, “in house”) además de las de colección, para aumentar el rigor de la validación. Se eligen siempre 1-2 cepas diana, 1-2 interferentes y 2-4 acompañantes; lo ideal es que en cada uno de estos tres tipos de cepas, una sea de colección y la otra nativa/salvaje de la zona geográfica donde trabajamos:

Cepas MICROKIT	Concentración	CV	Lote/Caducidad
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00087	$(1,72 \pm 0,52) \times 10E5$ ufc/lentícula	16,20%	26-03-2022
<i>Enterococcus faecium</i> WDCM 00178	$(1,24 \pm 0,46) \times 10E7$ ufc/lentícula	20,15%	07-10-2023
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00025	$(1,52 \pm 0,52) \times 10E6$ ufc/lentícula	18,33%	01-10-2022
<i>Burkholderia cepacia</i> MKTA 25416	$(1,75 \pm 0,45) \times 10 E5$ ufc/lentícula	25,71%	22-01-2023
<i>Micrococcus luteopaisa</i> (salvaje) CCTM12	$(4,94 \pm 1,26) \times 10E6$ ufc/lentícula	14,80%	25-06-2022

¿Por qué hemos elegido estas cepas como dianas, interferentes y acompañantes? ¿Cómo crecen en los medios?

Enterococcus faecalis es la cepa diana-1, un coco Gram positivo que crece en SB con colonias pequeñas, rojo intenso en 48h; en BEA con colonias crema-pardo que viran 2 mm del medio a su alrededor a negro en sólo 18h. Los enterococos son la única cepa catalasa negativa dentro de los aerobios, por lo que su confirmación es tan fácil como añadir reactivo en cualquiera de los medios y ver que no salen burbujas/espuma de sus colonias.

Enterococcus faecium es la cepa diana-2, un coco Gram positivo que crece en SB con colonias pequeñas, rosadas en 48h; en BEA con colonias crema claro que viran 2 mm del medio a su alrededor a negro en sólo 18h. Los enterococos son la única cepa catalasa negativa dentro de los aerobios, por lo que su confirmación es tan fácil como añadir reactivo en cualquiera de los medios y ver que no salen burbujas/espuma de sus colonias.

Pseudomonas aeruginosa es un Gram – no fermentador típico del agua, interferente porque a veces aparece en SB con colonias rojas o hialinas, según la cepa, aunque son de un tamaño muy superior a las diana. En BEA no hemos encontrado nunca que crezca ya que es un medio muy selectivo.

Burkholderia cepacia es un Gram – no fermentador típico del agua, interferente porque a veces aparece en SB con colonias hialinas. En BEA no hemos encontrado nunca que crezca al ser un medio selectivo.

Micrococcus luteopaisa es un aerobio Gram + típico del aire, contaminante habitual de medios, interferente porque a veces aparece en SB con colonias hialinas. En BEA no hemos encontrado nunca que crezca ya que es un medio muy selectivo. Es una cepa salvaje, con gran fuerza como interferente.

En Validaciones cuantitativas es mejor no mezclar varios microorganismos en una misma muestra, ya que la sinergia o antagonismo nos podría jugar malas pasadas en los resultados

teóricamente sumatorios. Mejor usar una cepa distinta en cada muestra, al menos en la mayoría de muestras positivas.

6. Procedimiento

6.1 Operativa con muestras inoculadas.

La técnica realizada en el laboratorio se puede resumir de la siguiente manera:

- Preparamos 30 botellas de 1,5 L de agua procedente del lote recién fabricado el mismo día de la validación. A estas botellas les quitamos a cada una 500 mL de agua para que quede 1 L por botella, las volvemos a cerrar y las rotulamos del 1 al 30.
- Si se deseara realizar estudio de la **reproducibilidad**, deberían inocularse y analizarse la mitad de las muestras un día y las restantes, que deben ser idénticas a las primeras, otro día y/o por otro analista. Si el laboratorio sólo dispusiera de un analista para microbiología, bastaría con que el mismo realizase los dos experimentos duplicados en dos días diferentes. Dada la poca información adicional que da este tema, a causa de la enorme incertidumbre microbiológica, nos conformamos con la componente repetitividad de la precisión. De modo que de cada botella saldrán 2 muestras teóricamente idénticas para el método estándar y otras 2 muestras teóricamente idénticas para el método rápido.
- Reconstituimos las cepas de laboratorio en tubos de 10 mL de solución salina marina al 0,9%, la que más oligoelementos contiene y por tanto mejor permite a cualquier cepa manifestarse posteriormente. Con meticulosidad para no perder ninguna de las lentículas que conforman las mismas, atemperadas para que se disuelvan, y agitando después, con un vortex para conseguir una correcta homogeneización. Realizamos las diluciones decimales pertinentes en tubos de 9 mL de la misma solución salina marina al 0,9%.
- Realizamos los negros de inóculo directo en placa, para cada cepa, en ambos medios, y por duplicado, repartiendo con asa Digrafsky las dianas en cada uno de los dos medios, y las interferentes en estría con asas calibradas de 100 µl. Así sabremos cual es la concentración real de las diana con la que nos encontramos en el momento de la validación y podremos corregir los valores teóricos inoculados sobre estos valores inóculo reales (en vez de los certificados en las cepas en su origen). Y sabremos cuál es el aspecto de cada interferente en los dos medios.
- Hacemos los cálculos para determinar la cantidad de inóculo que se deberá traspasar a cada botella de 1L (4 submuestras) para conseguir la cantidad aproximada de colonias que queremos en cada placa. Una vez determinado este valor, traspasamos dicho volumen de inóculo de cada cepa a las botellas con agua (muestras) con micropipetas y puntas estériles. Tras ello, agitamos con contundencia e insistencia cada una de las 30 botellas de muestras para su homogeneización lo más correcta que en microbiología se pueda conseguir.

- La concentración teórica de los distintos microorganismos inoculados en cada una de las 30 muestras se detalla en la “tabla del inóculo y resultados” anexada más adelante en el capítulo de resultados. Lo que se hizo con cada cepa fué:

Etc.faecalis $(3,92 \pm 1,38) \times 10^4$ ufc/lentícula, en tubo1 hay 4×10^3 /ml, en tubo 2 (dil 1:100 del tubo1) hay 4 ufc/0,1 ml, que al añadirse a 1 L de agua, contendría 1 ufc/250 mL = 1 col/placa

Etc.faecium $(1,44 \pm 0,26) \times 10^4$ ufc/lentícula, en tubo1 hay $1,4 \times 10^3$ /ml, en tubo 2 (dil 3:100 del tubo1) hay 4 ufc/0,1 ml, que al añadirse a 1 L de agua, contendría 1 ufc/250 mL = 1 col/placa

P.aeruginosa $(5,54 \pm 2,44) \times 10^7$ ufc/lentícula, en tubo 1 hay $5,5 \times 10^6$ /ml, en tubo2 (dil 1:100 del tubo1) hay $5,5 \times 10^4$ /ml, en tubo3 (dil 1:100 del tubo2) hay $5,5 \times 10^2$ /ml y en tubo 4 (dil 1:10 del tubo3) hay 5,5 ufc/0,1 ml, que al añadirse a 1 L de agua, contendría 1 ufc/250 mL = 1 col/placa

B.cepacia $(1,70 \pm 1,00) \times 10^8$ ufc/lentícula, en tubo 1 hay $1,7 \times 10^7$ /ml, en tubo2 (dil 1:100 del tubo1) hay $1,7 \times 10^5$ /ml, en tubo3 (dil 1:100 del tubo2) hay $1,7 \times 10^3$ /ml y en tubo 4 (dil 1:100 del tubo3) hay 1,7 ufc/0,1 ml, que al añadirse 0,3 ml a 1 L de agua, contendría 1 ufc/250 mL = 1 col/placa

M.luteopaisa $(1,80 \pm 0,80) \times 10^8$ ufc/lentícula, en tubo 1 hay $1,8 \times 10^7$ /ml, en tubo2 (dil 1:100 del tubo1) hay $1,8 \times 10^5$ /ml, en tubo3 (dil 1:100 del tubo2) hay $1,8 \times 10^3$ /ml y en tubo 4 (dil 1:100 del tubo3) hay 1,7 ufc/0,1 ml, que al añadirse 0,3 ml a 1 L de agua, contendría 1 ufc/250 mL = 1 col/placa

Luego, dado que la incertidumbre microbiológica nos aconseja jamás trabajar con 1 ufc, porque la probabilidad de no encontrarla en la porción de muestra analizada es elevadísima, calculamos los μ l necesarios de cada tubo para obtener el número deseado de colonias por placa, siempre a partir de un mínimo de 4 colonias/placa y un óptimo de al menos 8 colonias/placa. Los valores elegidos están plasmados en las tablas de resultados.

- Controles negativos para verificar que los medios empleados están estériles y que las muestras no llevan Enterococos en origen: A una de las muestras (la 1) no le añadimos ningún tipo de inóculo y será considerada como “muestra vacía”.
- Filtramos 250 mls de muestra por ensayo. La filtración se realiza con embudos de filtración estériles y filtros de membrana estériles. Se pone especial cuidado en esterilizar flameando con alcohol la base de cada embudo antes y después de cada filtración y que no queden residuos de alcohol. Una vez filtrados los 250 mL de muestra, se retira el filtro con cuidado de no esperar a que sufra entrada de aire (lo que podría estresar y hacer inviables algunas ufc) y se coloca en la placa de cultivo adecuada de cada uno de los dos métodos de placa (SB, BEA).
- Respetando al máximo los principios de precisión, para no añadir más incertidumbre a la innata en microbiología, en una de las dos rampas de 3 embudos, se anula uno de los 3 para dejar 2 operativos, y se inoculan siempre, para una misma muestra, los dos medios: mientras en la otra rampa se hace lo mismo para la réplica de muestras de la misma botella en los dos medios.

Como una de las rampas permitía que el segundo embudo filtrase mucho más deprisa que el primero, a partir de la muestra 6 se cambia el embudo anulado al lento y se observa que el tercero sí filtra a la misma velocidad que el segundo. Es irrelevante hasta aquí, ya que las 10 primeras muestras son los negativos, sin Enterococos.

- Tras colocar en ambos medios las membranas filtradas, todas las placas (incluidas las de los “negros” sin membrana) se incuban juntas (para disminuir la imprecisión, se mezclan en pilas de 8 en secuencia: SB-BEA-SB-BEA-SB-BEA-SB-BEA) a 37°C durante 18 horas (en teoría dejando las placas SB 48 h y depositando sus membranas acto seguido en otras plaquitas BEA para incubar 4 h a 44,5° C y confirmar según el método oficial). Como la realidad nos sorprende y el SB de MICROKIT ha resultado capaz de detectar diminutas colonias rojas de Enterococos en esas primeras 18h, no esperamos a que crezcan más y pasamos las membranas de SB a BEA directamente tras estas primeras 18h de incubación para incubar otras 24h.
- Transcurrido el tiempo de incubación se hace el contaje de las colonias sospechosas en cada una de las placas de cultivo. El recuento en BEA a las 18h resulta sumamente cómodo, al ser colonias pardas (*Etc.faecalis*) o crema (*Etc.faecium*) rodeadas de un halo negro de unos 2 mm muy bien visible por detrás de la placa (por debajo de la membrana). Las placas de SB en 18h se pueden leer sólo bajo la luz intensa de la cabina, al ser puntiformes, pero contrastan bien con la membrana blanca tanto las de *Etc.faecalis* (rojo intenso) como las de *Etc.faecium* (rosa).
- Si en el blanco y en los 10 negativos (muestras 1-10), salieran colonias típicas, descontaríamos su media (siempre que fuese baja, o tendríamos que repetir la validación). No ha sido el caso, afortunadamente y como era de esperar, dada la ínfima proporción de muestras naturales positivas que ya hemos mencionado.
- Se realiza la prueba inmediata de la catalasa sobre las colonias para confirmar que se trata de enterococos fecales (catalasa negativa: no burbujea espuma, todos los interferentes burbujean)

6.2 Control de la concentración de las cepas.

Control positivo “el negro” para comprobar la concentración real que existe en cada lote de cepas de referencia en el momento de la validación (en todos los medios empleados y, si queremos, en alguno de los certificados por el proveedor para poder comparar): recuento real obtenido en medio de cultivo general (TSA, del cual prescindimos por no aportarnos nada) y en los medios selectivos empleados (SB, BEA) para la cepa diana y las interferentes y acompañantes), SIN USAR NI EL MÉTODO DE ANÁLISIS NI LAS MUESTRAS, sembrando directamente las lenticúlas disueltas en solución salina marina al 0,9%. Sembramos en superficie las dos cepas diana con ayuda de asas de Digrasky estériles en los dos medios de cultivo utilizados en esta validación, con duplicado de placas. Se podrían emplear para estos negros, placas de 90 mm para evitar que, como en anteriores validaciones, el asa Digralsky no reparta

homogéneamente (lo cual sucede a menudo en plaquitas de filtración de 50-60 mm). El volumen de cepa inoculada en las placas se calcula para encontrar un número razonable (dentro del rango medio-bajo de recuento) de colonias en las placas. El inóculo se realiza con micropipeta y puntas estériles. En las cepas interferentes no hace falta recuento, sólo se siembra en estría para poder observar cómo son las colonias de cada una de ellas en cada uno de los dos medios comparados en esta validación.

La reducción de la carga en el experimento con respecto a estos recuentos negros nos dará la idea exacta de la pérdida de carga por emplear el método de filtración, pero sobre todo, nos permitirá saber si estos patrones de cepas se han reducido de forma importante desde el laboratorio fabricante como para aplicar a los resultados obtenidos el factor de reducción que encontremos en los negros.

Una vez incubadas las placas se realiza el contaje de colonias sospechosas en los 2 medios de cultivo, para verificar que realmente se trata de las cepas certificadas por el proveedor, como así es.

Lectura de los blancos: No hay falsos positivos debidos a contaminaciones propias de la muestra con el microorganismo diana, como se observa claramente en las muestras 1-10.

Lectura de los negros:

Cepa y concentración teórica ufc/placa	Nº colonias obtenidas SB	Nº colonias obtenidas BEA	Propuesta A de valor corregido (según cepa diana)
Diana 1 <i>E.faecalis</i>	2 de 8 0 de 8 Media 1 de 8 = 12,5%	1 de 8 8 de 8 Media 4,5 de 8 = 56%	Media reducción ambos medios sin necesidad de filtrar 2,75 de 8 = <i>E.faecalis</i> obtiene 34%
Diana 2 <i>E.faecium</i>	1 de 12 2 de 12 Media 1,5 de 12 = 12,5%	4 de 12 2 de 2 Media 3 de 12 = 25%	Media reducción ambos medios sin necesidad de filtrar 2,25 de 12 = <i>E.faecium</i> obtiene 18,7%
Propuesta B de valor corregido (según medio)	SB obtiene 12,5%	BEA obtiene 40,5%	
<i>P.aeruginosa</i>	Se detecta alguna placa con colonias hialinas	No crece en ninguna de las placas	No procede
<i>B.cepacia</i>	Se detecta alguna placa con colonias hialinas	No crece en ninguna de las placas	No procede
<i>M.luteopaisa</i>	Se detecta alguna placa con colonias hialinas	No crece en ninguna de las placas	No procede

Se demuestra la correcta estabilidad de las lentículas empleadas, al mantenerse el log inicial, pero habría que aplicar un factor de corrección acorde al % de reducción calculado en las dianas, porque las dianas han bajado de forma evidente respecto al valor certificado. Al ser este recuento

significativamente diferente ($>/<50\%$) del valor certificado por el proveedor de cepas, se deberían tomar como base del estudio estos resultados, en lugar de los certificados por el proveedor, a no ser que extrañamente los resultados de la validación se acercasen más a los certificados por el proveedor que al de estos blancos positivos (no ha sido así). O según un criterio más estricto, si el valor obtenido estuviera fuera de la incertidumbre certificada, se invalidaría este trabajo y habríamos de repetirlo con otro lote de cepas; pero nos parece un criterio demasiado ortodoxo, extraído de la química, para trabajar bajo él en microbiología.

Se evidencia ya desde los simples negros, la **mayor fiabilidad del medio BEA con respecto al SB**, ya que detecta un 40,5% del valor inóculo, frente al 12,5% que recupera el SB. Pero no podemos dar más valor al resultado de los negros que al de las 120 placas comparadas en la validación, sólo ser conscientes de que el BEA puede llegar a conseguir una exactitud 3 veces superior a la del SB. Por ello no aplicaremos el factor de corrección B.

Tampoco podemos diferenciar con suficiente nitidez (ni es el objetivo de este estudio) cuántas colonias crecen de cada una de las dos dianas en cada placa, para aplicar un factor de corrección diferente según sean *E.faecalis* (34%) o *E.faecium* (18,7%), de modo que tampoco aplicamos el factor de corrección A.

No se aplicarán estos factores de corrección porque los inóculos en ambos medios son teóricamente idénticos, y aunque la incertidumbre microbiológica juegue una mala pasada en algunas muestras, los árboles deben dejarnos ver el bosque: lo importante es comparar los resultados del medio rápido (BEA) con respecto al medio estándar (SB) en lo que se llama *recuperación absoluta*. De modo que según los criterios de la ISO 11133-2 de control de calidad de medios, que el BEA recupere como mínimo el 50% del valor conseguido por el SB; como ideal el 70%; y como excelente el 90% o más. En los resultados observaremos como el BEA ha recuperado el 97,14-147% con respecto al SB+BEA en rangos bajos y el 98,94% en rangos medio-altos, por lo que la exactitud del BEA es fantástica.

7. Resultados

Se observa una enorme similitud de resultados entre los 2 métodos comparados

En ningún caso han aparecido incontables o valores extremos que haya que descartar por discrepantes. Tampoco hay valores discrepantes que descartar según el test de Grubs simple, aplicado desde internet. Las muestras cuyos duplicados dan resultados muy diferentes (el caso más extremo es 0 ufc/250 mL, 7 ufc/250 mL en SB, muestra 11) insistimos en que no son aberrantes, sólo una prueba más de la enorme incertidumbre a la que nos enfrentamos en microbiología, inherente a la distribución natural de los microorganismos (distribución contagiosa) y que no podemos ni ignorar ni eliminar: aunque estemos 1 año agitando sin parar un frasco de 250 ml con 250 ufc, nunca conseguiremos que haya 1 ufc/mL.

No se encuentran diferencias significativas entre los dos métodos, en ninguno de los 3 rangos, son diferencias casuales (por ejemplo en positivos, la suma de colonias en BEA es de 279 y en SB+BEA de 281). En rangos bajos (que son los que más nos interesan en nuestras matrices) el BEA supera ligeramente al SB+BEA (119% de recuperación comparada) y en rangos altos es casi idéntica (99,3%).

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO:Enterococos fecales..... **NEGATIVOS**
 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 18h y 44h + (4-18) h 37°C FECHA: 29/XI/2021 a 1/XII/2021

BOTELLA	MATRICES Y CEPAS EN 3 RANGOS			INÓCULOS Y RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS				
	VALOR EJEMPLO	MOTIVO	VALOR REAL	cálculos	inóculo	BEA 18h	SB 18h	SB +BEA 48h
1	1: 0 diana+0 interf+0 acomp	Blanco	+ +	0	0	0	0	0
	2: Es 1 repe		+ +	0	0	0	0	0
2	3: 0 diana+8 interferente1	Falsos positivos (exclusividad)	+	P.aerug 16 ufc/L=4 col/placa	0,3 mL t4	0	0	0
	4: Es 3 repe		+	"	"	0	0	0
3	5: 0 diana+8 interferente 2		+	B.cep 20 ufc/L=5 col/placa	1,2 mL t4	0	0	0
	6: Es 5 repe		+	"	"	0	0	0
4	7: 0 diana+8 interferente 3		+	M.paisa 20 ufc/L=5 col/placa	1,2 mL t4	0	0 (hay col hialinas)	0 (hay col hialinas)
	8: Es 7 repe		+	"	"	0	0	0
5	9: 0 diana+64 interferente1		+	P.aerug 225 ufc/L=56 col/pl	0,5 mL t3	0	0	0
	10: Es 9 repe		+	"	"	0	0	0
6	11: 0 diana+64 interferente2		+	B.cep 278 ufc/L=69 col/placa	0,16 mL t3	0	0	0
	12: Es 11 repe		+	"	"	0	0	0
7	13: 0 diana+64 interferente3	+	M.paisa 300 ufc/L=75 col/pl	0,16 mL t3	0	0	0	
	14: Es 13 repe	+	"	"	0	0	0	
8	15: 0 diana+96 interferente1	+	P.aerug 550 ufc/L=137 col/pl	1 mL t3	0	0	0	
	16: Es 15 repe	+	"	"	0	0	0	
9	17: 0 diana+96 interferente2	+	B.cep 557 ufc/L=186 col/pl	0,33 mL t3	0	0 (hay col hialinas)	0 (hay col hialinas)	
	18: Es 17 repe	+	"	"	0	0	0	
10	19: 0 diana+96 interferente3	+	M.pais 600 ufc/L=200 col/pl	0,33 mL t3	0	0	0	
	20: Es 19 repe	+	"	"	0	0	0	

Interferentes: 1 *Pseudomonas aeruginosa* WDCM00025 ($5,54 \pm 2,44$) $\times 10^7$, 2 *B.cepacia* ATCC 25416 ($1,7 \pm 1,0$) $\times 10^8$, 3 *M.paisa* CCCTM12 ($1,8 \pm 0,8$) $\times 10^8$

Notas e incidencias:

No ha habido interferencias (falsos positivos) porque ambos medios son muy adecuados, y los interferentes aparecen muy ocasionalmente, y además como colonias perfectamente distinguibles de las diana (incoloras, frente a las rojas de las diana en SB y frente a las pardas con halo negro de las diana en BEA).

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO:Enterococos fecales..... **LIMITES DE CUANTIFICACIÓN**
 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 18h y 44h + (4-18) h 37°C FECHA: 29/XI/2021 a 1/XII/2021

BOTELLA	MATRICES Y CEPAS EN 3 RANGOS		INÓCULOS Y RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS				
	VALOR IDEAL:	MOTIVO:	cálculos	inóculo	BEA 18h	SB 18h	SB +BEA 48h
11	1: 4 ufc diana1	Límites cuantificación	16 ufc/L= 4 col/placa	0,4 mL t2	6	7	7
	2: Es 1 repe		"	"	3	0	0
12	3: 4 ufc diana2		16 ufc/L= 4 col/placa	0,4 mL t2*	0	7	7
	4: Es 3 repe		"	"	4	6	6
13	5: 6 ufc diana 1		24 ufc/L = 6 col/placa	0,6 mL t2	3	3	3
	6: Es 5 repe		"	"	3	5	6
14	7: 6 ufc diana 2		24 ufc/L = 6 col/placa	0,6 mL t2*	3	3	3
	8: Es 7 repe		"	"	1	2	2
15	9: 8 ufc diana 1		32 ufc/L = 8 col/placa	0,8 mL t2	5	3	3
	10: Es 9 repe		"	"	7	4	4
16	11: 8 ufc diana 2		32 ufc/L = 8 col/placa	0,8 mL t2*	3	2	3
	12: Es 11 repe		"	"	3	3	3
17	13: 100 ufc diana 1		400 ufc/L = 100 ufc/pl	0,1 mL t1	38	20	20
	14: Es 13 repe		"	"	37	57	57
18	15: 140 ufc diana 2		560 ufc/L = 140 col/pl	0,4 mL t1	48	27	36
	16: Es 15 repe		"	"	47	40	43
19	17: 200 ufc diana 1		800 ufc/L = 200 ufc/pl	0,2 mL t1	52	56	56
	18: Es 17 repe		"	"	55	64	64
20	19: 210 ufc diana 2		840 ufc/L = 210 col/pl	0,6 mL t1	47	55	55
	20: Es 19 repe		"	"	55	57	57

Diana: 1 *Etc. faecalis* WDCM00087, 2 *Etc. faecium* WDCM00178

Interferentes: 1 *Pseudomonas aeruginosa* WDCM00025 $(5,54 \pm 2,44) \times 10^7$, 2 *B.cepacia* ATCC 25416 $(1,7 \pm 1,0) \times 10^8$, 3 *M.paisa* CCCTM12 $(1,8 \pm 0,8) \times 10^8$

Notas e incidencias: *diana 2 el tubo 2 es dilución 0,3 mL a 9 mL, en vez de 0,1 mL a 9 L (necesitamos 9 réplicas de este tubo)

En 18h en SB se ven muy pequeñas y sólo bajo luz intensa de la cabina, mientras en BEA son muy evidentes gracias al halo negro de unos 2 mm que se ve por debajo alrededor de cada colonia. **Marcamos en rojo las lecturas que han aumentado en SB+BEA tras 24h adicionales de incubación (la diferencia resulta irrelevante)**

La casuística indica que hay muestras cuyo duplicado podría considerarse aberrante, pero como hemos agitado hasta la saciedad, lo que se demuestra en realidad es el concepto de incertidumbre microbiológica: por mucho que agitemos, jamás conseguiremos que 1000 ufc en 1000 mL se repartan en 1 ufc/mL

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO:Enterococos fecales..... **POSITIVOS**
 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 18h y 44h + (4-18) h 37°C FECHA: 29/XI/2021 a 1/XII/2021

BOTELLA	MATRICES Y CEPAS EN 3 RANGOS		INÓCULOS Y RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS					
	VALOR IDEAL:	MOTIVO:	Cálculos	inóculo	BEA 18h	SB 18h	SB +BEA 48h	
21	1: 8 diana 1	Rango bajo	32 ufc/L = 8 col/placa	0,8 mL t2	3	0	1	
	2: Es 1 repe		"	"	3	4	4	
22	3: 8 diana 2		32 ufc/L = 8 col/placa	0,8 mL t2*	5	3	3	
	4: Es 3 repe		"	"	2	0	1	
23	5: 4 diana 1+ 4 diana 2 + 4 interf 1 + 4 interf 2 + 4 interf 3		16 ufc/L = 4 col/placa 16 ufc/L = 4 col/placa 16 ufc/L = 4 col/placa 16 ufc/L = 4 col/placa	0,4 mL t2 0,4 mL t2* 0,15 mL t4 0,60 mL t4	1	5	5	
	6: Es 5 repe		"	"	11	3	3	
24	7: 24 diana 1		Rango medio	96 ufc/L = 24 col/placa	2,4 mL t2	15	11	11
	8: Es 7 repe			"	"	8	14	16
25	9: 24 diana 2			96 ufc/L = 24 col/placa	2,4 mL t2*	13	11	11
	10: Es 9 repe			"	"	10	5	8
26	11: 24 diana 1 + 48 interferente1	96 ufc/L = 24 col/placa 192 ufc/L = 48 col/placa		2,4 mL t2 0,375 mL T3	15	13	13	
	12: Es 11 repe	"		"	15	20	21	
27	13: 24 diana 2 + 48 interferente2	96 ufc/L = 24 col/placa 192 ufc/L = 48 col/placa		2,4 mL t2* 0,12 mL t3	14	6	9	
	14: Es 13 repe	"		"	12	12	13	
28	15: 100 diana 1	Rango alto, límite superior de cuantificación		400 ufc/L = 100 col/placa	0,1 mL t1	29	46	46
	16: Es 15 repe			"	"	58	35	35
29	17: 100 diana 2		400 ufc/L = 100 col/placa	0,29 mL t1	35	46	46	
	18: Es 17 repe		"	"	46	45	45	
30	19: 48 diana 1 + 48 diana 2 + 48 interf 1 + 48 interf 2 + 48 interf 3		192 ufc/L = 48 col/placa 192 ufc/L = 48 col/placa 192 ufc/L = 48 col/placa 192 ufc/L = 48 col/placa	4,8 mL t2 4,8 mL t2* 0,375 mL t3 0,12 mL t3	56	56	56	
	20: Es 19 repe		"	"	55	53	54	

Diana: 1 *Etc.faecalis* WDCM00087, 2 *Etc.faecium* WDCM00178

Interferentes: 1 *Pseudomonas aeruginosa* WDCM00025 $(5,54 \pm 2,44) \times 10^7$, 2 *B.cepacia* ATCC 25416 $(1,7 \pm 1,0) \times 10^8$, 3 *M.paisa* CCCTM12 $(1,8 \pm 0,8) \times 10^8$

Notas e incidencias: *diana 2 el tubo 2 es dilución 0,3 mL a 9 mL, en vez de 0,1 mL a 9 L (necesitamos 9 réplicas de este tubo)

8. Estudio estadístico de los datos

En toda validación cuantitativa partimos de las siguientes premisas, que sin embargo no deben hacernos “perder el Norte” de lo que queremos demostrar en la validación:

- a) Antes de realizar ningún cálculo, hemos de eliminar los resultados mal expresados (es decir, ilegibles, ambiguos, los expresados como <..., >..., cualitativos, inconcretos...) y los que no se proporcionan por duplicado o triplicado.
- b) Dada la distribución contagiosa (asimilada a la de Poisson) o heterogénea (denominada binomial negativa) que sufren los microorganismos en cualquier matriz, según la ISO 16140 habríamos de transformar todos los resultados a su logaritmo decimal (el log de 10^5 recordemos que es 5, el de $2,3 \times 10^5$ nos dice la calculadora que es 5,362, el de $8,9 \times 10^5$ según la calculadora es 5,949...) para así transformar dicha distribución en logNormal o de Gauss. Así podríamos ya calcular la media y la desviación estándar de todas las medidas. Esto solo es necesario realizarlo en servicios intercomparativos y en validaciones de “procedencia química”, ya que según veremos: 1-aumentando el nivel de exigencia en la comparación entre los resultados obtenidos y los esperables (o valor inóculo); 2-asimilando la exactitud al porcentaje de productividad respecto al medio estándar (exactitud absoluta) y respecto al valor inóculo diana (exactitud relativa); y 3-asimilando la precisión al CV (dispersión relativa a la media, por ejemplo en $5 \pm 0,7$, el CV% es $0,7/5 \times 100$); nos ahorraremos todos estos logaritmos y nos ahorraremos complicados cálculos para luego acabar con una comparativa que mide a palmos.
- c) Antes de realizar ningún cálculo, hemos de eliminar los resultados aberrantes (es decir, los que se alejan demasiado del valor inóculo a causa de una exagerada inexactitud y los que se alejan demasiado entre si por pares a causa de una exagerada imprecisión. Para ello podemos aplicar el test de Grubs o además el test de la mediana (eliminar resultados que están fuera del $\pm 50\%$ del valor de la mediana del total de resultados) para eliminar inexactitudes; y el test de Cochran para eliminar imprecisiones. En general se puede prescindir de estos test si se tiene criterio para descartar a simple vista los resultados excesivamente desviados. Y reiteramos que en microbiología, si se hacen las cosas bien, no hay resultados aberrantes: hemos agitado hasta la saciedad cada botella con inóculo y aun así, hay muestras con 0 ufc/250 mL y su duplicado con 7 ufc/250 mL, increíble dispersión, pero es real, no debida a errores en el método, y por tanto no podemos eliminarla solo porque lo diga una Norma ISO.
- d) Se considera valor asignado al valor inóculo certificado de las cepas; en el caso de que difiera significativamente de los negros (que hemos realizado para constatar si la cepa llegó en las mismas condiciones de exactitud y precisión en que salió del fabricante), se toma como valor asignado el obtenido en los negros. En este caso “diferir significativamente” quiere decir que el recuento del certificado y el recuento de los negros varía al menos 1 log; según otros autores demasiado estrictos (procedentes de escuelas químicas, para llegar a esas conclusiones en microbiología podrían haberse ahorrado hacer logaritmos), “diferir significativamente” quiere

decir que el recuento de los negros varía por encima de la desviación estándar certificada por el proveedor de las cepas (lo cual, sin embargo, es más que habitual incluso en las más exactas y precisas marcas de cepas cuantitativas, hecho que dificultaría su uso en las validaciones y por tanto, impediría realizar las validaciones más adecuadas, que emplean cepas cuantitativas que certifican su exactitud y su precisión). No estamos de acuerdo en aplicar a ciegas factores de corrección basados en los negros, a pesar de que el valor inóculo real haya bajado de forma muy importante (si observamos la tabla de resultados de los negros, sin intervenir el método de dilución de las cepas en la botella de agua y sin intervenir el método de filtración de membrana, han bajado un 66% en *E.faecalis* y un 81,3% en *E.faecium*, aunque siguen siendo bajadas que no llegan a 1 log, por lo que se consideran normales). Porque aquí no estamos para demostrar las virtudes o defectos de los dos medios comparados o de las cepas empleadas, sino para demostrar si el método rápido (BEA) es al menos igual de efectivo que el método estándar (SB+BEA), y no debemos perdernos del objetivo perdiendo el tiempo en comparar cepas con medios.

- e) La desviación estándar diana del inóculo es la que consideramos aceptable y suele estar 3 veces por encima de la obtenida en el certificado de la cepa cuantitativa. La desviación estándar robusta es la obtenida en el conjunto de datos, por eso también la llamamos desviación estándar global. En ensayos intercomparativos se considera que la desviación estándar diana debe estar 1/3 por debajo de la desviación estándar robusta, lo cual, al participar muchos laboratorios, suele ser muy fácil de cumplir.
- f) La incertidumbre del valor asignado requiere prudencia, como toda incertidumbre calculada en microbiología, dado que los mayores componentes de la incertidumbre microbiológica (estados metabólico e histórico de la cepa) no se pueden medir. Algunos autores sugieren que se calcule dividiendo la desviación estándar robusta o global por la raíz cuadrada del número de muestras analizadas (o en servicios intercomparativos, del número de laboratorios no descartados).
- g) Los valores “z” o z-scores se emplean en los servicios intercomparativos y resultan de calcular la diferencia entre el valor asignado y el valor medio obtenido por cada laboratorio, y dividirla por la desviación estándar. Esta herramienta corre el peligro de descalificar aberrantemente a los laboratorios que se han acercado, mucho más que la media de los demás laboratorios, al valor inóculo, sólo por el hecho de que los demás se hayan alejado mucho del mismo, creando así un valor consensuado aberrante. Los participantes deben estar al tanto y si se producen casos como el mencionado, protestar a la organización del servicio por haberles descalificado o calificado negativamente, cuando deberían ser felicitados por obtener los mejores resultados de todos los participantes (aunque se llaman servicios intercomparativos precisamente porque comparan laboratorios, independientemente de que los demás lo hayan hecho muy mal).
- h) El coeficiente de variación (CV %) resulta de dividir la desviación estándar global obtenida en el estudio por el valor medio obtenido en el mismo. Se emplea para asignar un valor de “incertidumbre microbiológica medible” en las cepas cuantitativas.

Para aprobar o no la validación del método de recuento de *Enterococos fecales*, se tendrán en cuenta los siguientes parámetros:

- **Límites de cuantificación o rango:** el rango dentro del cual se puede contar los resultados de una placa sin estar sometidos a posibles interferencias ni imprecisiones: En bacterias, en placa normal, se suele aceptar que es de 15-150 colonias/placa (= 15-150 ufc/100 ml de muestra de agua). Los enterococos forman colonias muy pequeñas, por lo que las placas con 300 ufc también se pueden contar adecuadamente, al no ocupar las 300 colonias más de 1/3 de la superficie de la placa.
- **Exactitud:** cercanía de los resultados respecto al valor teórico (elegimos como valor asignado el valor inóculo, o bien el valor corregido por la reducción de concentración detectada con los negros, en lugar del valor obtenido en los medios estándar, a causa de las interferencias antagónicas que han demostrado ciertos microorganismos con respecto a otros cuando estaban en el rango alto de recuento en placa). No obstante se estudia tanto la recuperación relativa (la obtenida respecto al valor inóculo) como la **recuperación absoluta** (la obtenida respecto a los medios estándar). Y en casos como el que nos ocupa, donde la bajada de concentración de las cepas ha sido importante, el valor que realmente nos interesa es el de recuperación absoluta (comparación de medios).
- **Precisión:** medida de dispersión de los resultados obtenidos respecto a su media. Medimos la repetitividad (grado de concordancia entre resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando, realizadas en las mismas condiciones de medición: tiempo, operario, muestras, laboratorio) y dejamos de lado la reproducibilidad (grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando, realizadas en diferentes condiciones de medición: con el mismo método y la misma muestra, pero con distintos operarios, tiempo, instrumentos, laboratorios, etc.) ya que implica duplicar el esfuerzo de la validación para finalmente no aportar ninguna mejora factible.
- **Linealidad:** grado de concordancia entre lo esperable (valor inóculo en ufc/ml) y lo detectado (valor obtenido en colonias/placa) en los diferentes rangos de recuento en placa. Aunque está demostrada mil veces porque es inherente al método microbiológico clásico de convertir células microscópicas en colonias visibles, lo repetiremos, al ser muy fácil de demostrar con los datos obtenidos.
- **Selectividad inclusiva:** escasez de falsos negativos empleando diferentes dianas
- **Especificidad exclusiva:** escasez de falsos positivos empleando diferentes interferentes
- **Robustez del parámetro:** Denominamos así la capacidad del parámetro *Recuento de Enterococos fecales* para obtener una elevada precisión de los resultados obtenidos 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, que viene en parte definida por los anteriores parámetros.
- **Incertidumbre de las medidas:** Es lo inverso a la certeza de los resultados que obtengamos para cada uno de los parámetros arriba indicados. Depende de las premisas que seamos capaces de detectar y medir, es decir, de los componentes que disminuyen la certeza en la obtención de

resultados. Actualmente sólo se tienen en cuenta, como estándar internacional, en el cálculo de la incertidumbre microbiológica, las componentes derivadas de la imprecisión y, en algunos casos, la componente derivada de las diluciones (pero lamentablemente tenidas en cuenta como analitos químicos, no como células vivas que, por su naturaleza externa polisacárida (que une unas con otras), sufren distribuciones contagiosas en forma de microcolonias, clusters o biofilms).

Una vez se han leído las placas, se hará la media y desviación estándar para cada rango de medida. Los resultados obtenidos servirán para evaluar y validar si el método de recuento de *Enterococos fecales* es adecuado o no con la ayuda de los resultados de exactitud y de precisión obtenidos.

8.1 Límites de cuantificación

Son los límites por debajo y por encima de los cuales los resultados obtenidos tienen asociada una imprecisión no admisible.

El recuento en placa suele tener como límite inferior de cuantificación 15 colonias/placa y por debajo de este recuento ya no se habla de *recuento* sino de *valor estimado*. En cuanto al límite superior, varía en función del tamaño colonial de las cepas diana. Este valor máximo suele aceptarse como 1/3 de la superficie total de la placa ocupada por colonias (2/3 de la placa sin colonias).

En el caso de estudio se han fijado por normativa técnica ISO en límite inferior 15 colonias/placa y en límite superior 150 colonias /placa.

El límite superior se puede solventar en caso necesario (placas incontables o confluentes) repitiendo el trabajo con diluciones decimales de la muestra, pero como nuestro límite de aceptabilidad en este caso es 1 colonia/placa (1 ufc/100 ml de agua), no tiene sentido.

En cambio el límite inferior de cuantificación se debe considerar equivalente al límite de detección de los métodos cualitativos, ya que no existe forma de mejorarlo. Por ello, al dispararse la incertidumbre por debajo de 15 colonias/placa, en tales casos no se habla de recuentos sino de “valor estimado <15 ufc/100 ml”.

Por todo ello, consideramos una pérdida de tiempo y recursos tener que recontar por el método de filtración de membrana, para que después legislativamente, tengamos que demostrar el indemostrable 0 ufc/100 ml (que equivale en microbiología a <1 ufc/100 ml); sería más lógico emplear métodos P/A y reportar presencia cuando hay *Enterococos fecales* y ausencia cuando no los hay, aunque legislativamente se nos obligue a contar. Dado que los métodos P/A se han demostrado muchísimo más robustos y excelentes detectores en contra de los métodos de Filtración de Membrana y del Número Más Probable.

En el rango medio de recuento en placa es donde la incertidumbre suele ser menor y por tanto los resultados son los más fiables. Por eso algunas escuelas de validación como la de Farmacopea, sólo miden la exactitud alrededor de 100 ufc/placa, lo cual nos parece demasiado simplista.

Resultados de los límites de cuantificación

Se calcula a partir de la tabla de resultados de límites de cuantificación. Aunque sólo hemos podido demostrar que hemos sido capaces de detectar desde 4 ufc/250 mL en el rango bajo (detectando 6, 3, 0 y 4 colonias/placa en BEA-18h, y 7, 0, 7 y 6 colonias/placa en SB+BEA-48-72h), lo cual está genial teniendo en cuenta lo que ya hemos repetido acerca de la incertidumbre microbiológica, que es un disparate en recuentos muy bajos, por debajo de 15 colonias/placa; eso no significa que no seamos capaces de detectar valores más cercanos al 1 ufc/250 mL; sólo significa que no hemos conseguido inóculos de 1 ufc/250 mL (ni jamás los conseguiríamos, ni nosotros ni nadie). Hicimos inóculos bajos de 4, 6 y 8 ufc/250 mL porque en la mayoría de validaciones más estrictas, se demuestra la capacidad de encontrar 6 ufc, de modo que hemos superado con excelencia la detección a rangos muy bajos. De hecho, es a partir del inóculo de 6 ufc/250 mL, que hemos podido detectar en todas las muestras (3, 3, 3 y 1 colonias/placa en BEA-18h y 3, 6, 3, 2 colonias/placa en SB+BEA-48-72h)

En cuanto al límite superior de cuantificación, aunque las colonias tan diminutas como las de estreptococos podrían dejarnos contar hasta 300 colonias/placa, inoculamos un máximo de 210 ufc/250 mL (detectando 47, 55, 55 y 57 colonias/placa). Eso no significa que no seamos capaces de detectar valores más cercanos al 300 ufc/250 mL sólo significa que tampoco hemos conseguido inóculos que realmente tuvieran 210 ufc/250 mL (esos sí que repitiendo el experimento varias veces, quizá podríamos conseguirlos y que las ufc en el agua realmente llegasen a ser unicelulares; pero no tiene sentido cuando lo que estamos demostrando aquí es que somos capaces de detectar Enterococos fecales cuando están presentes; nos han convertido por Ley un método cualitativo: “no debe haber ni un solo Enterococo fecal en 250 mL de muestra” es decir “debe haber 0 o ausencia”; en un método cuantitativo que luego se compara al cualitativo: “cuenta cuántos hay y si hay más de 0, el lote no vale”

8.2 Exactitud

Para calcular el valor de exactitud del método utilizado, se calculará el promedio de los resultados, en cada rango (y la desviación estándar).

La exactitud o % recuperación relativa es el porcentaje de desviación de la media de cada rango con respecto al valor teórico del inóculo de cepas patrón. También calcularemos la recuperación absoluta, comparando el recuento en BEA, con respecto al recuento en SB+BEA, como método clásico estándar, o incluso lo hubiéramos podido hacer con respecto a un medio general como TSA. Aunque al disponer de cepas cuantitativas certificadas, a menudo confiamos más en el criterio de la recuperación relativa, en este caso no, al haber mermado las cepas en los negros una media del 87,5% en SB+BEA y del 59,5% en BEA.

El valor de exactitud resultante da idea del grado de concordancia entre el resultado de análisis y el valor de referencia aceptado, dando una aproximación al porcentaje de recuperación.

Para estandarizar los valores de aceptabilidad de la exactitud, la podemos asimilar a la fertilidad de forma análoga a lo indicado en el anexo sobre la fertilidad de los medios generales (90%) y selectivos

(70% o incluso 50%) en la Norma 11133-2 sobre preparación de medios de cultivo generales y selectivos).

Resultados de Exactitud

Se calcula a partir de los resultados de la tabla de positivos; los resultados de la tabla de límites de cuantificación no suelen ser aplicables aquí.

- Exactitud (recuperación relativa respecto al valor inóculo)

No es lo que realmente nos importa (lo es la recuperación absoluta entre ambos métodos que veremos a continuación), pero aun así estos son los datos de recuperación respecto al inóculo de las cepas diana:

BEA directo: Las recuperaciones medias respecto al valor inóculo son, en las muestras generales (406 colonias/824 ufc) del 49,27%; si aplicásemos el factor de corrección de los negros (recuperaron el 40,5% en BEA), nos saldría una recuperación relativa del 121,65%

SB: Las recuperaciones medias respecto al valor inóculo son, en las muestras generales (388 colonias/824 ufc) del 47,00%; si aplicásemos el factor de corrección de los negros (recuperaron el 12,5% en SB), nos saldría una recuperación relativa del 376%

SB + BEA: Las recuperaciones medias respecto al valor inóculo son, en las muestras generales (401 colonias/824 ufc) del 48,67%; si aplicásemos el factor de corrección de los negros (recuperaron el 12,5% en SB), nos saldría una recuperación relativa del 389%

Del mismo modo que sucedió con los negros, ha bajado de forma importante la carga del inóculo, no sabemos si por deterioro de las cepas en el viaje o si por algún mal hábito en el análisis (por ejemplo, flamear las fritas de las rampas de filtración y no esperar que el alcohol haya desaparecido al 100%)

Lo que sí se observa una superioridad del método rápido con respecto al estándar, aunque sea muy ligera (6,00 %). Deben considerarse métodos con recuentos idénticos, aunque el BEA da los resultados en 18 h y el clásico SB+BEA tarda 48-72h.

Si siguiéramos (aunque no nos corresponde) los criterios de la Norma ISO 11133-2 sobre control de calidad de medios, toda exactitud relativa de un medio selectivo que supere el 50% del valor inóculo, se debe considerar adecuada, por tanto podríamos considerar muy adecuada la recuperación relativa conseguida en ambos medios, que es prácticamente de ese 50%, dado que aquí no estamos simplemente comparando cepa con medio, sino que las cepas han pasado por un proceso de dilución en botella de un litro, seguido de otro proceso de filtración de membrana estresante.

Por todo ello consideramos que los valores de recuperación relativa en esta validación no aportan nada fiable y es mejor dejarlos de lado.

Pero lo que más nos importa de toda la validación viene ahora, la recuperación absoluta del BEA en 18h con respecto al método estándar SB+BEA en 48-72h:

- Exactitud (recuperación absoluta respecto a los medios oficiales)

Cuando hay una gran influencia de la flora natural (no inoculada) del agua, no resulta buen baremo comparar la recuperación media de cada medio selectivo, con respecto a la del medio general TSA. Es

más lógico referir sólo la recuperación absoluta del BEA con respecto al SB+BEA (aprovechamos que en SB pudimos ver colonias a las 18h y comparamos también):

Medio	Exactitud medida como recuperación absoluta
BEA 18h/ SB+BEA 48h	406 colonias/401 colonias = 101 %
SB 18h/ SB+BEA 48h	388 colonias/401 colonias = 96,76 %

El BEA recupera en sólo 18 h un **101 %** con respecto al método oficial SB+BEA de 48h, lo cual concuerda con otras validaciones de este mismo método rápido, donde el BEA siempre obtiene en menos tiempo no solo resultados similares, sino mejores (111 %, 116,87 %)

Concluimos ante ambas formas de medir la exactitud (relativa y absoluta), que el medio que mejor se comporta ha sido el BEA, superando la exactitud del método oficial SB+BEA. Sumado ello a su mayor rapidez (18 h de incubación en vez de las 48-72h del SB+BEA) y del gasto del método oficial con doble medio, hacen plantearse seriamente el cambio de medio SB+BEA a BEA.

Haciendo la misma comparativa en el rango bajo de recuento en placa (4-8 ufc/250 mL), que es el más interesante en nuestras muestras:

Medio	Exactitud medida como recuperación absoluta en el rango bajo
BEA 18h/ SB+BEA 48h	25 colonias/17 colonias = 147 %
SB 18h/ SB+BEA 48h	15 colonias/17 colonias = 88 %

En los rangos bajos de recuento en placa, los que más nos interesan, el BEA recupera en sólo 18 h, nada menos que un **147 %** con respecto al método oficial SB+BEA en 48-72h, lo cual supera con creces los baremos estándar de recuperación relativa (>90%, en las escuelas más estrictas >95%)

Haciendo la misma comparativa en el rango medio de recuento en placa (24-48 ufc/250 mL):

Medio	Exactitud medida como recuperación absoluta en el rango medio
BEA 18h/ SB+BEA 48h	102 colonias/105 colonias = 97,14 %
SB 18h/ SB+BEA 48h	92 colonias/105 colonias = 87,62 %

En los rangos medios de recuento en placa, el BEA recupera en sólo 18 h casi lo mismo (97%) que el método oficial SB+BEA en 48-72h, lo cual supera con creces los baremos estándar de recuperación relativa (>90%, en las escuelas más estrictas >95%)

Y haciendo la misma comparativa en el rango alto de recuento en placa (96-100 ufc/250 mL):

Medio	Exactitud medida como recuperación absoluta en el rango alto
BEA 18h/ SB+BEA 48h	279 colonias/282 colonias = 98,94 %
SB 18h/ SB+BEA 48h	281 colonias/282 colonias = 99,64 %

En los rangos altos de recuento en placa, el BEA recupera en sólo 18 h casi lo mismo (99%) que el método oficial SB+BEA en 48-72h, lo cual supera con creces los baremos estándar de recuperación relativa (>90%, en las escuelas más estrictas >95%)

8.3 Precisión

Mide la dispersión de los resultados obtenidos en las diferentes réplicas respecto el valor promedio. Se puede calcular sobre los duplicados de placas, sobre muestras duplicadas idénticas, sobre datos repetidos en diferentes días, sobre datos obtenidos por distintos analistas, sobre datos obtenidos por diferentes laboratorios...

Tiene dos componentes: repetitividad (la que obtenemos con réplicas en nuestro laboratorio en un mismo experimento) y reproducibilidad (la que obtenemos mediante z-scores en ensayos intercomparativos y con replicas de analistas y el mismo analista en diferentes días).

Mediremos la precisión-repetitividad, en cada uno de los 3 rangos (como imprecisión), como coeficiente de variación: % de "precisión media" relativa a (dividido por) el recuento medio obtenido.

Ej: Dados unos resultados de media y desviación $3,7 \pm 1,4$, se calculará CV como $1,4 / 3,7 = 37,84$.

Que es precisamente una herramienta estadística inversa a las z-scores empleadas en los servicios intercomparativos, donde se admite que los valores logarítmicos son adecuados mientras se mantengan entre ± 2 . Análogamente, mientras el CV no sea superior al 100%, deberíamos considerar correcta la repetitividad. Aún así, en los casos en que el CV sea superior al 90%, se descartarán dichos casos por aberrantes (y si la validación es más estricta, si el CV es >70% o incluso >50%, a menudo es muy difícil conseguir una precisión cuyo CV sea >25%).

Y dejaremos la precisión-reproducibilidad para los futuros ensayos intercomparativos en que participemos, cuyos informes anexaremos a la presente validación. Aunque si se tratase de una validación más compleja, deberíamos medir esta componente ADEMÁS replicando este experimento en distintos días y para los diferentes analistas.

En este caso tenemos en cuenta los duplicados de placas de muestras teóricamente idénticas (misma botella), pero en otros casos también podríamos tener en cuenta las otras formas de medir la precisión, enumeradas al comienzo de este capítulo.

La **incertidumbre** es lo contrario de la certeza. *Por poner un ejemplo, si paseamos bajo la lluvia y deja de llover, podemos ver mientras caminamos que aún caen 3 gotas del lado izquierdo de un tejado y ninguna del lado derecho, lo que nos llevaría a la conclusión de que el lado izquierdo es más grande. Qué certeza tiene este resultado? Ninguna, ya que si nos paramos un minuto, probablemente veamos caer unas 200 gotas del lado izquierdo y también unas 200 del lado derecho; en este caso la incertidumbre es enorme.* La incertidumbre de los resultados que obtengamos en la validación depende del número de premisas que hemos sabido detectar, del número de parámetros que intervienen en la medida. El haber hecho tantas muestras nos libera de aplicar estadística más compleja, al disminuir las componentes de la incertidumbre, la cual en microbiología no se puede aplicar como en química, ya que no son medibles los dos mayores componentes de la incertidumbre microbiológica (1-sobre todo el estado metabólico de la cepa en el momento del experimento: latencia, fase exponencial de crecimiento, fase de meseta, fase de caída o fase de letargia o subletalidad, de ahí los conceptos “no vivificables, no cultivables...”, dada la inmortalidad de los seres unicelulares excepto por destrucción celular; 2-pero también su historia metabólica, que le puede hacer rechazar un nuevo alimento o medio de cultivo durante días hasta que su genética lo reconozca como comida “pon un microorganismo junto a lo que sea, y acabará comiéndoselo”). Otros argumentos de peso en contra de un cálculo veraz de la incertidumbre microbiológica expandida son las siguientes premisas que nadie ha tenido en cuenta en el cálculo de la incertidumbre microbiológica: 3-los microorganismos no se distribuyen homogéneamente en ninguna muestra, sino contagiosamente (aunque nos pasemos toda la mañana agitando 100 ufc en 100 ml, nunca obtendremos 1 ufc/ml) y hacer una conversión logNormal para convertir la distribución de Poisson (o la binomial negativa) en Normal, es sólo un artefacto estadístico que no resuelve la raíz del problema; 4-los microorganismos tienen un comportamiento impredecible, caótico, formando a veces sinergias en su crecimiento, otras veces antagonismos y otras veces indiferencias entre unas cepas y otras, e incluso entre diferentes miembros de una misma cepa; 5-la unidad de medida en microbiología no sólo es entera (sin decimales) sino que es la ufc, que puede estar formada por una o por muchas células “microclusters o microcolonias” de modo completamente impredecible; 6-el tipo de matriz puede actuar de forma completamente diferente en el crecimiento de una misma cepa, lo que vuelve a hacer dicho crecimiento completamente impredecible; 7-el empleo durante la validación de matrices no estériles y el uso de cepas cuantitativas de amplia incertidumbre inicial (ej: <100 ufc de algunas marcas significa 50 ± 49 , algo absolutamente intolerable) no permiten realizar un cálculo válido de la incertidumbre de la medida; 8-muchos microorganismos pueden crecer a temperatura ambiente, incluso duplicando su población en sólo 20 minutos, lo que arroja otra componente no medible a la incertidumbre durante el experimento de validación; 9-cada medio de cultivo se comporta de modo diferente con un mismo microorganismo, obteniendo recuperaciones aceptadas entre un 50 y un 90%, por ejemplo un medio de recuento de aerobios puede recuperar una cepa concreta (por ejemplo

Staphylococcus aureus) en un 15% o incluso en un 0% y no por ello deja de ser válido, ya que está destinado al recuento de una población que denominamos “aerobios”, que puede incluir unas cepas del ejemplo de *S.aureus* y no otras de sus cepas; otro ejemplo de la componente “incertidumbre no medible” del medio de cultivo: podemos (y solemos) obtener un mayor recuento de coliformes en VRBL que de Enterobacterias en VRBG, en una misma muestra, cuando esto es inaudito para los no-microbiólogos, al ser todos los coliformes enterobacterias, pero muchas enterobacterias no son coliformes, por lo que en teoría siempre habrá más enterobacterias que coliformes y “debería” haber siempre más colonias en VRBG que en VRBL. Otras componentes de la incertidumbre microbiológica, que son tenidas en cuenta por algunos químicos que incursionan en validación microbiológica, son las debidas a las diluciones, a las colonias procedentes de más de 1 ufc por solapamiento (colonias mixtas de la misma o de diferentes cepas), al ratio de colonias identificadas por placa, a la experiencia/competencia del analista y a las condiciones puntuales de Temperatura y tiempo de incubación; son también importantes, pero resultan tan despreciables como las de la fórmula de incertidumbre (incertidumbre de la cepa, incertidumbre de la repetitividad e incertidumbre de la reproducibilidad) si consideramos los demás factores mencionados, cuyo peso en la incertidumbre real se dispara. Las Normas ISO sobre validación de métodos microbiológicos (ISO 16140, ISO 13843) y sobre equivalencia de métodos (ISO 17994) no tienen en cuenta casi ninguna de estas consideraciones microbiológicas, por lo que los microbiólogos no podemos tenerlas en cuenta a ellas. Todo esto no significa que si el método microbiológico es tan impreciso (respecto al químico), nosotros nos podamos permitir ser imprecisos también, de modo que haremos nuestro trabajo con el máximo esmero para que otra de las componentes no medibles de la incertidumbre microbiológica (el analista, su estado metabólico durante el experimento y su competencia técnica) se minimice en todo lo posible.

Si se desea, se puede calcular una incertidumbre medible, sumando el cuadrado de la incertidumbre certificada de la cepa y el cuadrado del coeficiente de variación obtenido en la repetitividad (y en la reproducibilidad, si se puede). Pero hemos de ser conscientes de que la incertidumbre real es muy superior a esta “incertidumbre derivada sólo de la imprecisión”, por causa de componentes no medibles, sobre todo los que hemos detectado y resumido en el párrafo anterior. De modo que ese cálculo deberíamos considerarlo un valor sin relevancia.

Resultados de Precisión

En este caso tenemos en cuenta las réplicas de muestras teóricamente idénticas, pero en otros casos también podríamos tener en cuenta las otras formas de medir la precisión, enumeradas al comienzo de este capítulo 8.3. No calculamos la precisión en SB-18h por ser un método que no era objeto de esta validación y además, que se hayan visto colonias en sólo 18h en este medio no es lo normal en muestras naturales. Calcularemos la precisión del BEA-18h y del SB+BEA-48-72h a partir de los resultados de la tabla de positivos; los resultados de la tabla de límites de cuantificación no son aplicables aquí, ya que la incertidumbre se dispara a niveles tan bajos.

- Precisión en BEA en 18h en los pares de muestras idénticas

Rango de Medida	Tabla positivos $X_{21} - X_{30}$	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
8 ufc/250 mL	3,3 5,2 1,11	0 2,12 7,07	0% 60,61% 117,85%
24 ufc/250mL	15,8 13,10	4,95 2,12	43% 18,44%
	15,15 14,12	0 1,41	0% 10,88%
96-100 ufc/250mL	29,58 35,46 56,55	20,51 7,78 0,71	47,14% 19,21% 1,27%
Precisión media en todos los rangos			31,84%

- Precisión en SB+BEA en 48-72h en los pares de muestras idénticas

Rango de Medida	Tabla positivos $X_{21} - X_{30}$	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
8 ufc/250 mL	1,4 3,1 5,3	2,12 1,41 1,41	84,85% 70,71% 35%
24 ufc/250mL	11,16 11,8	3,54 2,12	26,19% 22,33%
	13,21 9,13	5,66 2,83	33,28% 25,71%
96-100 ufc/250mL	46,35 46,45 56,54	7,78 0,71 1,41	19,21% 1,55% 2,57%
Precisión media en todos los rangos			32,14%

Como es habitual, la precisión no depende del medio y es similar en ambos

- Precisión en BEA en 18h en la suma de muestras de rango bajo

Rango de Medida	Rtos. bajos	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
8 ufc/250 mL 4, 6, 8 ufc/250 mL	3,3 5,2 1,11	0 2,12 7,07	0% 60,61% 117,85%
	6,3 0,4 3,3	2,12 2,83 0	47,14% 141,42% 0%
	3,1 5,7 3,3	1,41 1,41	70,71% 23,57% 0%
Precisión media en el rango bajo			51,26%

- Precisión en SB+BEA en 48-72h en la suma de muestras de rango bajo

Rango de Medida	Rtos. bajos	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
8 ufc/250 mL 4, 6, 8 ufc/250 mL	1,4 3,1 5,3	2,12 1,41 1,41	84,85% 70,71% 35,36%
	7,0 7,6 3,6	4,95 0,71 2,12	141,42% 10,88% 47,14%
	3,2 3,4 3,3	0,71 0,71	28,28% 20,20% 0%
Precisión media en el rango bajo			48,76%

Como es habitual, la imprecisión se dispara en el rango bajo

- Precisión en BEA en 18h en la suma de muestras de rango medio

Rango de Medida	Rtos. medios	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
24 ufc/250mL	15,8 13,10	4,95 2,12	43% 18,44%
	15,15 14,12	0 1,41	0% 10,88%
Precisión media en el rango medio			18,08%

- Precisión en SB+BEA en 48-72h en la suma de muestras de rango medio

Rango de Medida	Rtos. medios	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
24 ufc/250mL	11,16 11,8 13,21 9,13	3,54 2,12 5,66 2,83	26,19% 22,33% 33,28% 25,71%
Precisión media en el rango medio			26,88%

Como es habitual, la mejor precisión se obtiene en el rango medio

- Precisión en BEA en 18h en la suma de muestras de rango alto

Rango de Medida	Rtos. altos	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
96-100 ufc/250mL	29,58 35,46 56,55	20,51 7,78 0,71	47,14% 19,21% 1,27%
140, 200, 210 ufc/250 mL	38,37 48,47 52,55 47,55	0,71 0,71 2,12 5,66	1,89% 1,49% 3,96% 11,09%
Precisión media en el rango alto			12,29%

- Precisión en SB+BEA en 48-72h en la suma de muestras de rango alto

Rango de Medida	Rtos. altos	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
96-100 ufc/250mL	46,35 46,45 56,54	7,78 0,71 1,41	19,21% 1,55% 2,57%
140, 200, 210 ufc/250 mL	20,57 36,43 56,64 55,57	26,16 4,95 5,66 1,41	67,94% 12,53% 9,43% 2,53%
Precisión media en el rango alto			16,54%

Aunque lo llamemos rango alto (96-210 ufc/250 mL) relativo a los 3 rangos conseguidos, solo hemos conseguido llegar al rango medio (20-64 ufc/250 mL), por ello la precisión resulta tan buena

- Comentarios

La menor precisión (mayor CV %) se ha dado en todos los medios en el rango de recuento más bajo, como es habitual a causa de la incertidumbre del reparto de inóculo en los tubos de diluciones más bajas. La precisión media en el BEA es del 31,84%, y en SB+BEA es del 32,44%, valores bastante aceptables y muy similares entre sí.

El mejor valor de precisión lo obtiene el rango bajo-medio de BEA (12,29%-18,08%), seguido del rango bajo-medio de SB+BEA (16,54%-26,88%). En casi todos estos casos la precisión es inferior al 25% (la cumbre de la excelencia en precisión microbiológica).

Como es habitual, la precisión depende mucho más del rango que del medio empleado.

Como criterio de aceptabilidad debe saberse que los CV de 10-70 % son habituales en las cepas cuantitativas de alta calidad como las empleadas. Cuanto menor sea el valor absoluto del CV%, más correcta será la precisión (menor imprecisión CV%). Valores de CV superiores al 70% deben hacernos pensar en mejorar los experimentos, aunque sean inferiores al estándar más básico del 99% que siguen

empleando muchos laboratorios, incluidos algunos fabricantes de cepas cuantitativas. CV% inferiores al 25% se suelen considerar excelentes por los estándares más estrictos.

No existe criterio de aceptabilidad en la precisión, según Norma ISO 16140, lo cual hace aberrante emplear sus complejos cálculos estadísticos, para luego no saber a qué atenerse.

Si se desea realizar estudio de la **reproducibilidad**, deben inocularse y analizarse la mitad de las muestras un día y las restantes, que deben ser idénticas a las primeras, otro día y/o por otro analista. Si el laboratorio sólo dispone de un analista para microbiología, basta con que el mismo realice los dos experimentos duplicados en dos días diferentes. Dada la poca información adicional que da este tema, nos conformaremos con extraerla de los servicios intercomparativos en los que participemos.

8.4 Linealidad: grado de concordancia entre lo esperable (ufc/250 ml) y lo detectado (colonias/placa) en los diferentes rangos de recuento en placa:



En nuestro caso la linealidad ha quedado demostrada porque las medias obtenidas se acercan evidentemente a los valores inóculo, en cada uno de los rangos.

En BEA:

Rango de Medida	Rtos. medios
8 ufc/250 mL	4 colonias/placa
24 ufc/100mL	13 colonias/placa
96-100 ufc/100mL	68 colonias/placa

En SB+BEA:

Rango de Medida	Rtos. medios
8 ufc/250 mL	3 colonias/placa
24 ufc/100mL	13 colonias/placa
96-100 ufc/100mL	67 colonias/placa

La linealidad del recuento en ambos métodos queda demostrada (aparte de demostrarse de nuevo la concordancia y equivalencia de recuentos entre ambos métodos).

Como siempre suele suceder en microbiología, la linealidad es adecuada en los recuentos en placa, no observándose valores lejanos a lo esperado, y subiendo el número de colonias/placa proporcionalmente a como suben las ufc/250 mL.

8.5 Selectividad inclusiva (Inclusividad): escasez de falsos negativos con diferentes dianas. Se extraen los datos de la tabla de positivos. En el 100% de los casos han sido correctamente detectadas ambas cepas diana cuando estaban presentes en cualquier rango (incluso en recuentos tan bajos como 4 ufc/250 mL cada una de las dos cepas diana). Se demuestra así la selectividad inclusiva del 100% para los dos métodos BEA-18h y SB+BEA-48-72h.

8.6 Especificidad exclusiva (Exclusividad): escasez de falsos positivos con diferentes interferentes. Se extraen los datos de la tabla de negativos (falsos positivos) y de la tabla de positivos en los que había además interferentes. No observamos diferencias entre los diferentes interferentes/acompañantes, que en el 100% de los casos han sido correctamente descartados cuando estaban presentes, con o sin la diana, en cualquier rango, ya que sus colonias eran hialinas en vez de rojas, rosas, pardas o beige. Ni siquiera era necesario realizar la confirmación de la catalasa. Se demuestra así la especificidad exclusiva del 100% para los dos métodos BEA-18h y SB+BEA-48-72h.

8.7 Robustez del parámetro Enterococos fecales: precisión entre los resultados de exactitud de los diferentes métodos ensayados.

El BEA recupera un 101 % más que el SB+BEA, muy similar (un 1% en microbiología no es significativo, es prácticamente idéntico). No en vano el parámetro Enterococos fecales es el más robusto de cuantos parámetros microbiológicos hemos conocido en 20 años de intercomparación: se emplee el método que se emplee, se use el medio que se use, sea quien sea el analista, esté donde esté ubicado el laboratorio, sea cual sea la muestra, todos detectan y enumeran adecuadamente los Enterococos fecales.

8.8 Incertidumbre de las medidas obtenidas arriba: Insistimos en que los cálculos actuales de incertidumbre de la medida microbiológica, al estar derivados de validaciones químicas, son muy sesgados y se basan prácticamente sólo en la incertidumbre de la precisión y, en el peor de los casos, incluyen la componente de las diluciones como si de analitos químicos se tratase. Los componentes más importantes de la incertidumbre microbiológica, que hemos listado en páginas anteriores, no son medibles; por tanto el valor que obtenemos de la incertidumbre es muy inferior a la realidad. Aplicando la fórmula de incertidumbre más básica:

$$U = \sqrt{(CV \% \text{ cepa diana})^2 + (\text{repetitividad})^2 + (\text{reproducibilidad})^2}$$

Unas incertidumbres calculadas cercanas al 50% son normales en microbiología y no indican que estemos fuera de ningún criterio de aceptabilidad.

Desconocemos la reproducibilidad mientras no participemos en servicios intercomparativos, por lo que este componente de la incertidumbre no se puede añadir.

No añadimos la componente de la dilución de las cepas por dos motivos: 1) porque los microorganismos sufren distribución contagiosa y por más que agitemos 100 ufc en 10 ml nunca vamos a conseguir

obtener 10 ufc en cada ml; y 2) porque las fórmulas estándar disparatan la incertidumbre en este punto, al estar calculadas para analitos químicos, y ya bastante disparatada es la incertidumbre microbiológica a causa de las demás componentes antes mencionadas que no se tienen nunca en cuenta en las fórmulas estándar.

Otras componentes de las que hablan algunos autores tampoco se pueden tener en cuenta en este cálculo, como son: la veteranía del analista, el % de colonias confirmadas, las colonias procedentes de más de 1 ufc por solapamiento (colonias mixtas de la misma o de diferentes cepas), las condiciones puntuales de Temperatura y tiempo de incubación... esto sumado a las otras componentes que hemos listado antes y ni siquiera se mencionan en las monografías sobre el cálculo de la incertidumbre microbiológica, hacen de la medición de ésta un tema tan controvertido que cada vez más autores ni siquiera contemplan su cálculo.

Realidades de la validación de métodos microbiológicos:

Existen ciertas escuelas de validación de métodos microbiológicos, que piden una serie de criterios que no hemos contemplado, explicamos aquí por qué:

1-Indicar la composición de los medios para demostrar que sí son los oficiales: se añade aunque para eso están las fichas técnicas de producto. Además no es sólo la composición lo que permite a un medio de marca X ser mucho más efectivo que otro medio supuestamente idéntico de marca Y, sino además la calidad del agar-agar, la de los demás componentes, la efectividad de la mezcla de las diferentes granulometrías de cada componente, el volumen total de polvo mezclado, la homogeneidad de todos los componentes según la proporción que supone cada uno de los componentes en el total del medio... Por eso una validación realizada con un medio concreto de marca X no es extrapolable a la marca Y, ni a la Z.

2-Incluir TSA como medio de contraste. Eso ya lo indica oficialmente la ISO 11133-2 de control de calidad de medios de cultivo y es un trabajo redundante en una validación que lo que ha de demostrar es la destreza en la aplicación del método rápido con respecto al método oficial.

3-Employar las cepas indicadas en ISO 11133, siempre que se encuentren comercialmente en formato cuantitativo, aunque se añadan otras más como interferentes y acompañantes para mejorar el contraste. Eso sí lo hacemos, incluso en parámetros como este, que habla de algo tan poco concreto taxonómicamente como "Enterococos fecales", analizamos con las dos dianas más comunes de enterococo fecal que aparecen en la ISO 11133, no solo una: *Etc.faecalis* y *Etc.faecium*

4-Usar muestras naturales que no hayan sido artificialmente inoculadas con las cepas diana. Dado que quien escribió eso no pensaba en matrices donde la probabilidad de encontrar el patógeno o indicador en una muestra, es muy inferior al 1 por mil, como sucede en las aguas envasadas, no tiene sentido

retrasar durante décadas una validación de un método rápido, ya que tardaríamos menos años en esperar a que la legislación se actualizase al siglo XXI en este parámetro.

5-Asumir el % mínimo de recuperación de la diana según ISO 11133 (en medios selectivos, recuperar un 50% del valor inóculo), aunque poner otro % máximo nos parece fuera de toda lógica: no podemos descartar un medio o método porque sea mucho mejor que el oficial, que para eso comparamos con idénticas concentraciones teóricas de cepas ambos métodos.

6-Emplear las pruebas de confirmación según Norma. Hay casos en los que no nos vamos a tirar a un pozo sólo porque lo diga una Norma ISO (ej: PYR, reactivo retirado desde hace décadas del mercado, para distinguir Enterococos fecales asociados al hombre de Estreptococos fecales asociados a animales, cuando ambos indican exactamente lo mismo: infiltración de aguas residuales; otro ejemplo: fosfatasa ácida en *Clostridium perfringens* con reactivos cancerígenos, cuando en realidad nos da igual que sea o no perfringens, ya que todas las esporas de Clostridium en un agua son indicadoras de infiltración de aguas naturales sucias, no filtradas). En el caso de los Enterococos, la Norma olvida la prueba más evidente y rápida, ya que los enterococos fecales son los únicos aerobios (facultativamente anaerobios en este caso) que son catalasa negativos: sus colonias no burbujean espuma con reactivo de la catalasa; lógicamente será esta prueba inmediata la que nos permitirá confirmar si los crecimientos son de Enterococos fecales (colonias sin emisión de espuma) en vez de malgastar tiempo y dinero en galerías de identificación, látex y otros productos creados para microbiología clínica que no nos interesan para nada.

7-Indicar claramente que las aguas no se han esterilizado previamente a su inoculación (por lo que podrían contener dianas que nos resultan desconocidas, aunque ya hemos dicho antes que con una probabilidad tan baja, que se descarta, además se detectaría en las muestras negativas como “falso positivo”). Y si se trata de aguas de consumo humano, con cloro, indicar que se han tratado con TioSulfato Sódico, para evitar malas interpretaciones.

8-Indicar que los analistas durante todos los pasos de la validación son los responsables del laboratorio, dedicándose el asesor externo exclusivamente a acompañar/guiar la validación y corregir si encuentra alguna mala práctica en los responsables del laboratorio

9-Emplear herramientas estadísticas confusas, propuestas en la ISO 16140 de validación de métodos microbiológicos, cambiando artificialmente la distribución natural de los microorganismos (contagiosa, cercana a la distribución denominada de Poisson), o heterogénea (denominada binomial negativa) a la habitual en química (distribución Normal o de Gauss), convirtiendo los datos a sus logaritmos e inventando una supuesta distribución logNormal que lo único que hace es medir a palmos. Esto es una aberración que no vamos a asumir. Los microorganismos en cualquier matriz están distribuidos al azar, por dos motivos principales: agrupación con exopolisacáridos de células madre y células hijas; y agrupación de células a partículas orgánicas o inorgánicas; en una porción de muestra habrá 7 ufc, en otra 90 y en otra ninguna. Y podemos estar toda una vida agitando 100 ufc en 100 ml de agua, para jamás obtener 1 ufc/mL. Eso no tiene arreglo estadístico y mientras quienes elaboran esas Normas ISO

no lo asuman, seguirán matando moscas a cañonazos, como también hacen en el tema del cálculo de la incertidumbre microbiológica (que existe, es enorme, pero no se puede calcular porque olvidan al menos 9 componentes cruciales en su fórmula de dos componentes calcadas de las químicas). Aplicaremos coeficientes de variación CV% (ej: 230 ± 50 , lo de la derecha del \pm dividido por lo de la izquierda, es decir $50/230$ %) para medir la precisión que conseguimos del método en los números naturales que encontremos y seremos tolerantes si en una muestra encontramos 9 colonias y en su réplica ninguna. El criterio de moda con CV% en microbiología es que sean $<25\%$, pero eso puede ser fácil de conseguir en unos microorganismos concretos e imposible en otros. Ya que en ISO 16140, tras manipular todos los datos y emplear estadística compleja en la precisión, se permiten no hablar de valores guía, nosotros nos permitiremos también esa licencia.

10-Seguiremos empleando medios alternativos que sepamos funcionan mejor que los normativos, ya que eso no contradice la lógica y profesionalidad que debe seguir rigiendo nuestro trabajo; ni nadie puede exigirnos que no usemos un método oficial y además, en duplicado, un método rápido que hayamos validado en paralelo como mejor que el oficial. El autocontrol no está reñido con los resultados oficiales.

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

La **exactitud absoluta respecto al medio oficial** es excelente:

BEA directo 18 h respecto a SB+BEA 48-72h: 101 % (en el rango bajo de recuento en placa 147%, en el rango medio 97,14% y en el rango alto 98,94%)

La **precisión** medida como CV %, no llega en ninguno de los 3 rangos a un nivel inadmisibles del 90%, por lo que cumple el criterio de aceptabilidad en los tres medios. En casi todos los casos en los recuentos medios-altos ha sido < 25 %, excelente, al ser éste el baremo que se pide a laboratorios acreditados ISO 17025. Y en el rango muy bajo, roza el 50% segundo nivel de aceptabilidad e precisión microbiológica (el tercer nivel está en $<70\%$):

BEA directo 18 h del 51,26% en rango muy bajo, del 18,08% en el rango bajo-medio y del 12,29 % en rango medio-alto

SB+BEA 48-72h del 48,76 % en rango muy bajo, del 26,88% en el rango bajo-medio y del 16,54 % en el rango medio-alto

Valores bastante similares, ya que la precisión depende mucho más del analista y del inóculo que del medio

La **Linealidad**, la **Selectividad inclusiva**, la **Especificidad exclusiva** y la **Robustez paramétrica** han quedado excelentemente demostradas en los tres métodos.

Por todo ello, se considera validado el parámetro de recuento de *Enterococos fecales* en nuestras muestras con el método de recuento rápido BEA 18h, de modo que podemos usarlo desde el mismo instante en que firmemos este informe. La peor opción es la oficial (SB+BEA), al suponer más trabajo, mucho más tiempo (lecturas a las 48-72 horas), el coste de dos medios y resultados que no mejoran en absoluto el método que hemos validado.

Dada la disyuntiva entre lo legislado (ej: 0 ufc/250 mL) y lo que los laboratorios podemos demostrar estadísticamente en cuanto al límite inferior de cuantificación, a causa de la distribución contagiosa que siguen los microorganismos en las muestras naturales (por mucho que agitemos 300 ufc en 100 ml, nunca conseguiremos que haya 3 ufc/ml) y dado que por debajo de 15 colonias/placa la incertidumbre no nos deja contar, para evitar malentendidos con los clientes, inspectores y auditores, cuando no obtengamos colonias pondremos “No detectado” (nunca 0 ufc/250 mL), como permiten algunas Normas ISO (ej: recuento de *Legionella pneumophila*) y si así se nos exigiese, pondremos: “recuento **estimado** < 15 **col/placa**”.

Se complementa y se mantiene la presente validación mediante la participación en ejercicios de **Intercomparación** con otros laboratorios a lo largo del año.

Se considerará caducada la presente validación, y por ello habrá que repetirla, si hay cambios que puedan afectar de manera significativa a los resultados analíticos: cambio de medios de cultivo o de casa comercial aunque declaren fabricar la misma fórmula del medio MICROKIT que hemos validado, cambios de tipo de membranas filtrantes, cambio de tipos de matrices (aguas emvasadas), cambios en el procedimiento...

10. Bibliografía

- *Guía para la validación de ensayos microbiológicos y ejemplos de protocolos*. MICROKIT, 2006
- UNE-EN-ISO 7899-2, Detección y recuento de *Enterococos fecales en aguas*.
- Real Farmacopea Española, 3ª edición.
- Validación de análisis de aguas. 11 pp. MICROKIT © 09-Julio-2009

11. ANEXOS

- 1-Estudio de las Posibles causas de aparición de resultados anómalos
- 2-Propuestas de mejora para próximas validaciones
- 3-Fotografías de la validación (del proceso y de las lecturas de resultados)
- 4-Certificados de control de calidad de los medios, kits y cepas utilizados

12. Personas que han realizado paso a paso la validación, cargos, fechas y Firmas:



Jorge Sanchis Solera, Supervisor externo, Lab.MICROKIT, KosmLab



Anónimos, Responsables del laboratorio de microbiología y del Departamento de calidad de una planta envasadora de aguas de España

3 de Diciembre de 2021

[ANEXO 1](#)

[Estudio de las Posibles causas de aparición de resultados anómalos](#)

La bajada de los recuentos (en ambos métodos por igual) de las dianas (tanto en los negros como en las muestras), con respecto a los valores inóculo teóricos. Aunque es inherente al método microbiológico (quienes hemos sido durante décadas coordinadores de ensayos intercomparativos sabemos que el valor consensuado baja a menudo 1 log, incluso 2 y hasta 3 respecto al valor inóculo) no deja de ser chocante. Aún así no ha sido una bajada tan drástica, no ha llegado ni siquiera a 1 log, que es lo más común en intercomparación.

[ANEXO 2](#)

[Propuestas de mejora para próximas validaciones](#)

Podemos intentar separar más las células de cada ufc en los negros, empleando para ellos placas de 90 mm, a ver si conseguimos un número de colonias por placa más cercano a la realidad, y realizar triplicados de estas placas, aunque en las muestras no podemos mejorarlo, al ser las membranas oficiales de 47 mm de diámetro

[ANEXO 3](#)

[Fotografías de la validación](#)

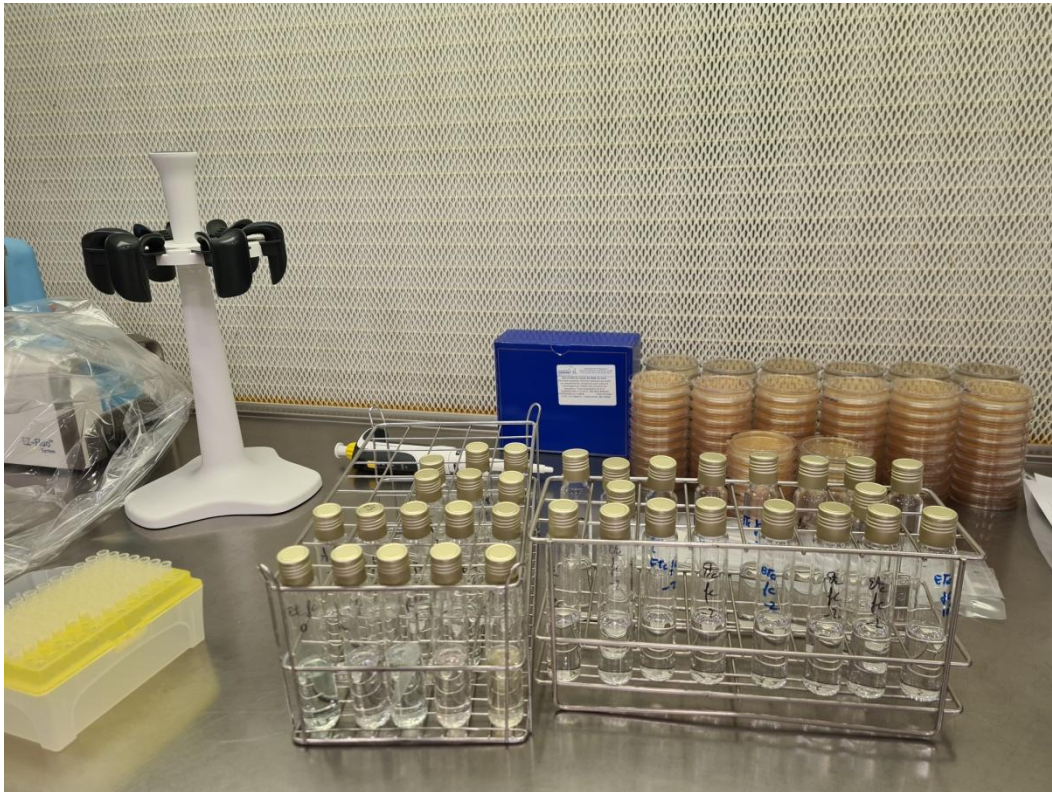
Ver pdf aparte

[ANEXO 4](#)

[Certificados de control de calidad de los medios, kits y cepas utilizados](#)

Ver aparte

Fotografías de la validación de Enterococos



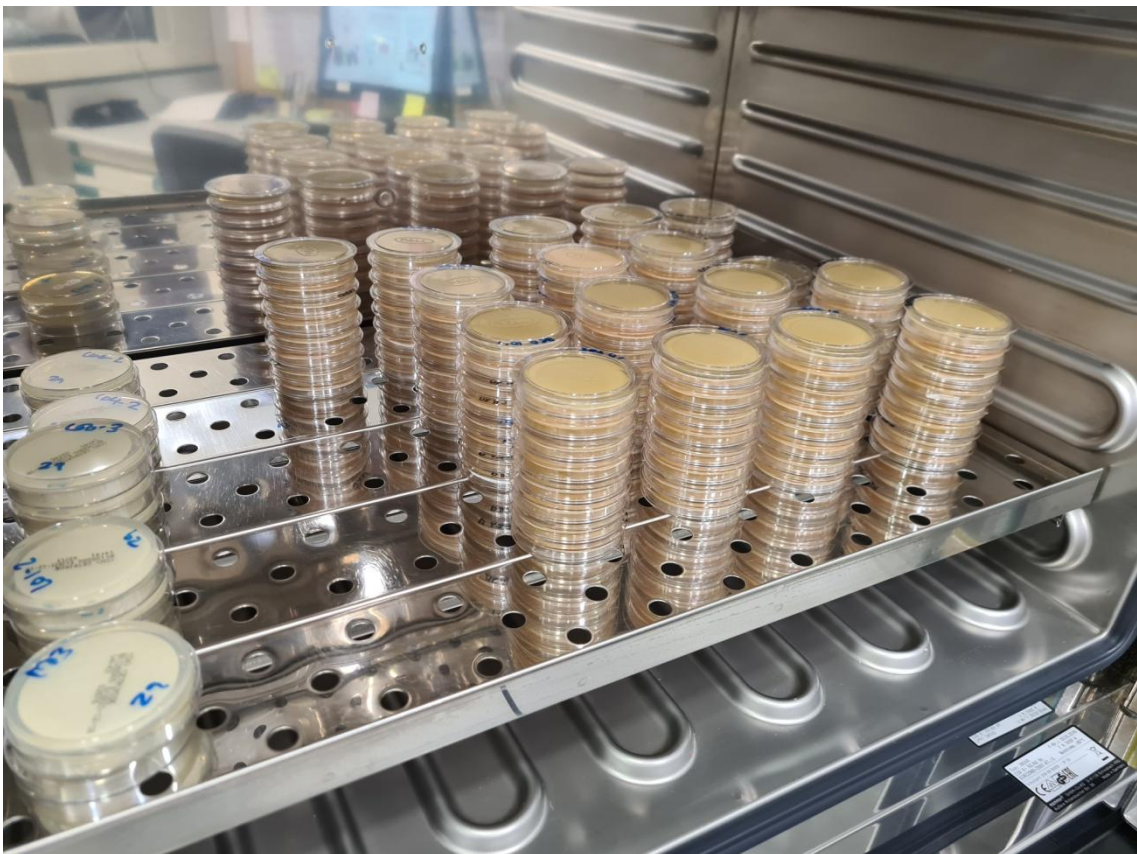
Preparación de los inóculos de cepas y sus diluciones. Rotulado de las placas.



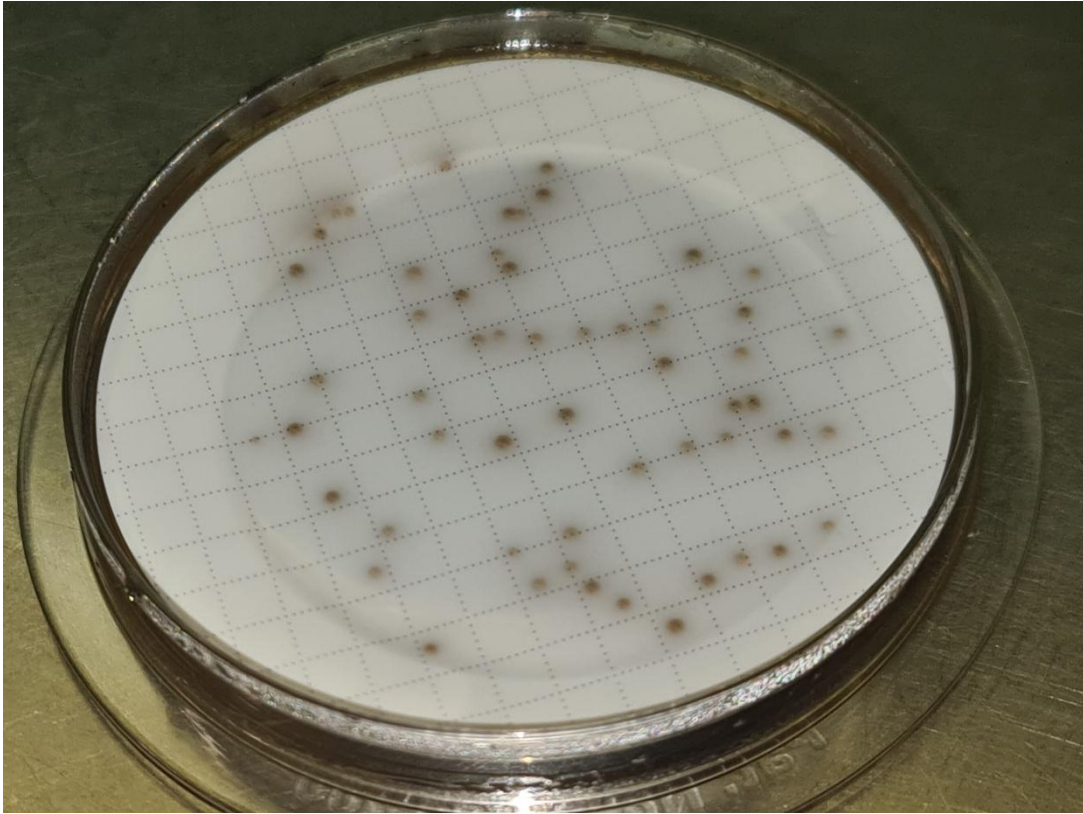
Uso de dos rampas de filtración para las 4 muestras simultáneas (2 medios de cultivo y sus pares)



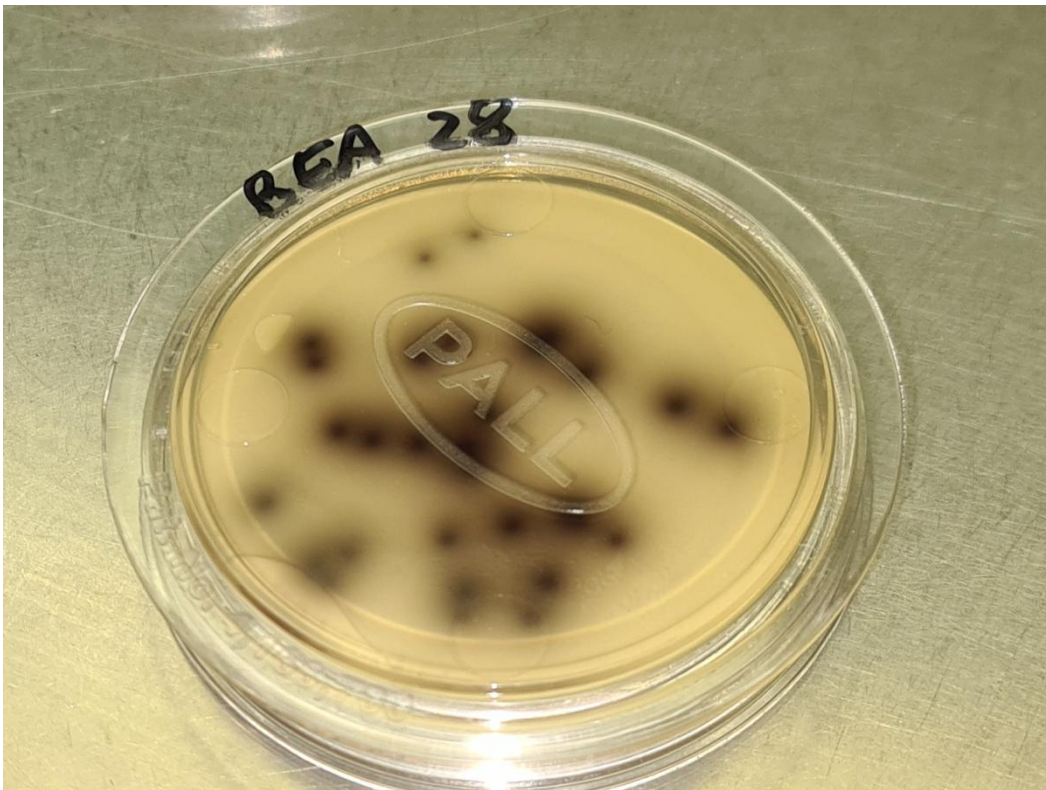
Colocación de las membranas filtradas sobre el medio de cultivo



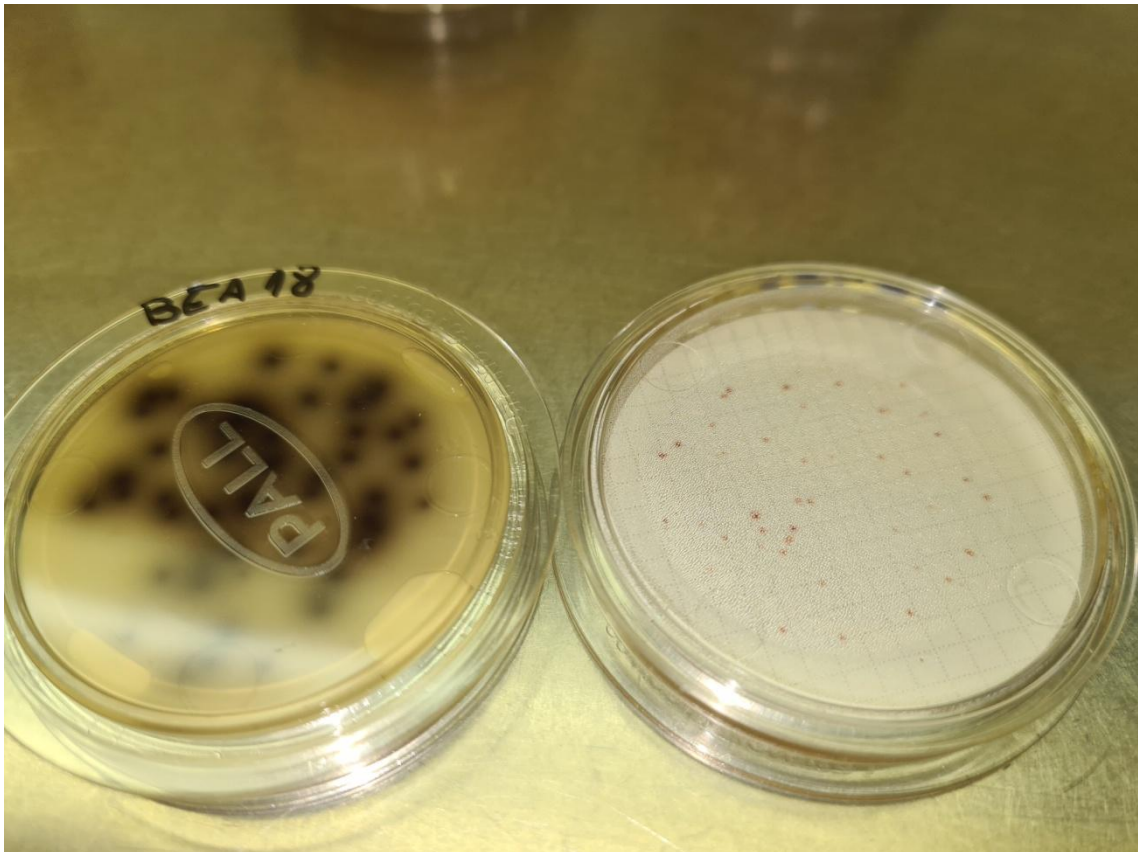
Incubación simultánea de las 120 placas de muestras y los negros de cepas



Resultados BEA directo en 18h. Las colonias más oscuras son de *Enterococcus faecalis* y las menos oscuras de *Enterococcus faecium*.



Resultados BEA directo en 18 h visto por debajo. Los halos negros alrededor de las colonias permiten una visión inequívoca de los enterococos fecales.



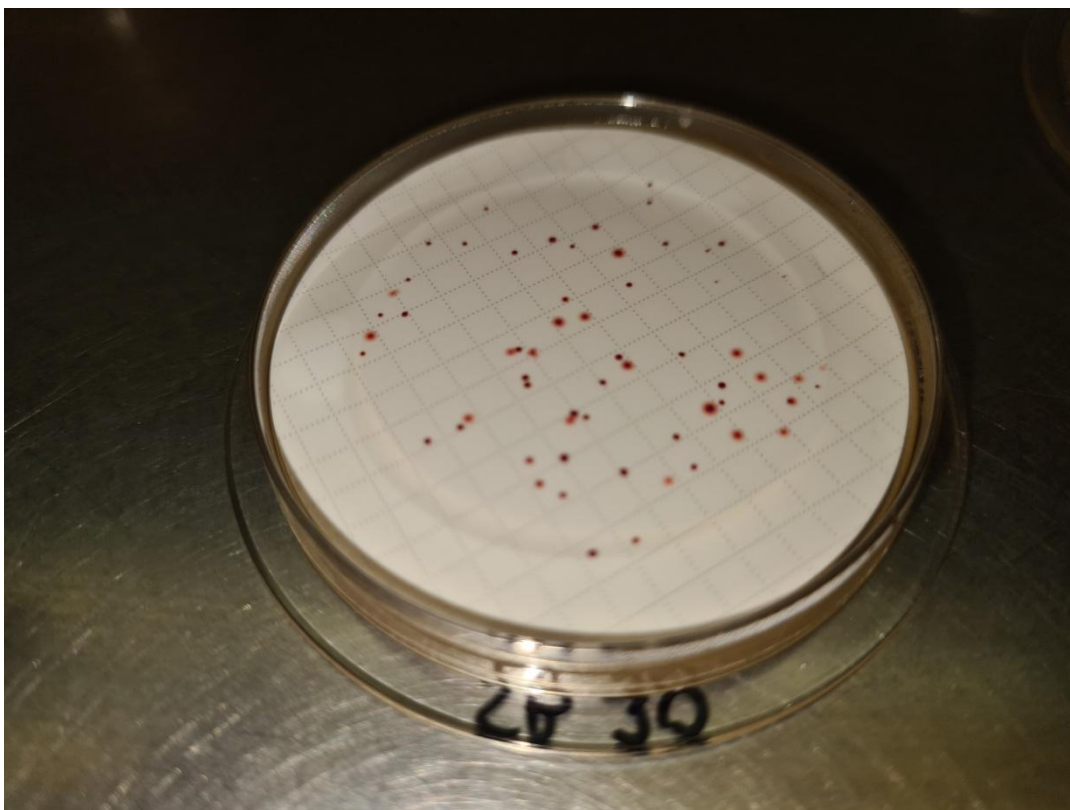
Resultados: Visión más nítida de los enterococos fecales en BEA que en SB, al formar halos negros por detrás.



Traspaso de las membranas desde SB hasta BEA en el método estándar lento



Colocación de la membrana en BEA tras su incubación en SB, en el método estándar lento



Resultados SB. Las colonias rojo intenso son de *Enterococcus faecalis* y las rosadas de *Enterococcus faecium*. Tras pasarlas por BEA están rodeadas de un halo oscuro.