

**INFORME DE VALIDACIÓN CUANTITATIVA DETECCIÓN Y
RECuento DE *Pseudomonas aeruginosa* EN LABORATORIO
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-Personas que han realizado paso a paso la validación, acompañadas-guiadas por el asesor de MICROKIT, cargos, fechas y Firmas

1. Objetivos

El método estándar de recuento de *Pseudomonas aeruginosa* ISO 16266 tiene un grave problema: tarda un mínimo de 48-72 horas en proporcionar resultados fiables, porque el medio de cultivo Cetrimida CN no proporciona buen contraste entre la colonia y el filtro en las primeras 24 horas de incubación, por lo que hay que esperar incubaciones de 48 h para distinguir los crecimientos. Este error ya lo subsanaron los Reales Decretos 140-2003, 314-2016 y 902-2018 para *E.coli*, cambiando del medio no selectivo Tergitol TTC, por el uso directo del medio selectivo CCA (MugPlus) de máximo contraste. 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 y cromogénico de *Pseudomonas aeruginosa* Rapid CN Pseudomonas Agar, 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 *Pseudomonas aeruginosa*, son idóneos, con resultados aptos y fiables, y determinar la exactitud (cercanía a la realidad) y precisión (variaciones entre réplicas de la misma muestra y duplicados de ambos medios) del método rápido 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. 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 *Pseudomonas aeruginosa*. Es evidente la importancia de contrastar con medios más rápidos que el estándar, como es el uso directo del medio cromogénico Rapid CN Pseudomonas Agar (que no es más que el medio estándar CN Agar al que se ha añadido un cromógeno que vira las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* a rosa-rojo y así las hace evidentes desde las primeras 18-24h), lo cual nos ahorra 1 día a la hora de tomar decisiones, 1 de los 2 días de stock de producto terminado, con el inmenso coste 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 (CN Agar 48h),
- 2- directamente con el medio selectivo rápido (Rapid CN Pseudomonas Agar 24h en vez de 48h), el método rápido o directo que proponemos y ya ha sido validado con excelencia en varias envasadoras
- 3- sus sendas réplicas idénticas (en vez de muestras duplicadas similares) para el estudio de la precisión

El que pretendemos validar, se trata de un método rápido (18 h) basado en la Norma ISO 16266, incluso exactamente con el mismo medio normativo CN Agar, pero optimizado con la adición de un cromógeno al medio.

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 una jornada de trabajo entera ocupados.

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).

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, 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 la 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.

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, 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. 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 haremos 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; 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 *las Pseudomonas aeruginosa* quedan relativamente inhibidas 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. Eso sí, muestras 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, las aguas cuyo recuento esperable de *Pseudomonas aeruginosa* 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, 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 intentan 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, aunque a mayor número de colonias, menos es su tamaño por competencia de nutrientes en el medio (se acepta 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 *Pseudomonas aeruginosa* 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 100 ml para obtener 18 colonias/placa, que ya es un valor muy cercano al de 15 col/placa arriba comentado y lo dejamos así porque de este modo no hace 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 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 (nº 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 en el anexo de "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 13 de Diciembre de 2021, los resultados se leen en 18-24h (el 14 de Diciembre) para el método rápido y el 15 de Diciembre para el método estándar, y el informe se acaba de redactar, el día 23 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (no hace falta en muestras tan limpias la T° selectiva de $44,5^{\circ}\text{C}$)
- 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
- 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 CN Agar	Lote: 19543 Cad: 26/08/22
Plaquis Rapid CN Pseudomonas Agar	Lote: 19536 Cad: 26/08/22
M-Ident Oxidasa en tiras estables	Lote: HC 15765528 Cad: 30/04/22 23
Tubos ADH para distinguir Pseudomonas de Burkholderia	Lote: 2112/3843 6 Cad: 25/11/2022
Tubos Acetamida	Lote: 2112/3843 9 Cad: 25/11/2022
Reactivo Nessler	Lote: 1879850129 Cad: 30/03/23

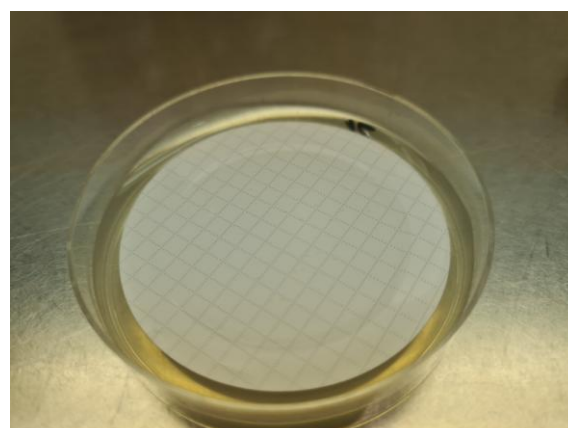
Composición de los medios empleados (en g/L):

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.

CETRIMIDA CN AGAR:

Peptona pancreática gelatina	16,0 g
Hidrolizado de caseína	10,0 g
Cetrimida	0,2 g
Cloruro magnésico	1,4 g
Sulfato potásico	10,0 g
Agar-agar	15,0 g
Ácido Nalidíxico (SMS034Z) *	0'015 g/l



Ambos medios tras incubar 18-24 horas

RAPID CN PSEUDOMONAS AGAR:

Peptona pancreática gelatina	16,0 g
Hidrolizado de caseína	10,0 g
Cetrimida	0,2 g
Cloruro magnésico	1,4 g
Sulfato potásico	10,0 g
Agar-agar	15,0 g
Ácido Nalidíxico (SMS034Z) *	0'015 g/l
Mezcla cromogénica *	c.s.



* Se añaden una vez el medio autoclavado se ha enfriado a 47°C.
Las placas preparadas ya llevan estos aditivos

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>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>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00087	$(1,72 \pm 0,52) \times 10E5$ ufc/lentícula	16,20%	26-03-2022
<i>Micrococcus luteopaiza</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?

Pseudomonas aeruginosa es la cepa diana, un Gram – no fermentador típico del agua, que crece en CN Agar, en 48h, con colonias lobuladas, crema (a veces pigmentadas de amarillo, verde o azul, más intenso a mayores tiempos de incubación y también si se resiembraba en Agar King A), fluorescentes bajo luz UVA de 366 nm (en las cepas poco fluorescentes, la luz verde azulada que emiten se ve mejor tras resiembra en King B Agar). En Rapid CN *Pseudomonas* Agar crece igual pero ya se ve en sólo 18-24h por su color rosa-rojo de contraste. Es oxidasa positivo en unos segundos, ADH negativo (se mantiene rojo tras incubación de 24h, a diferencia de su interferente *Burkholderia*) y Acetamida/Nessler positivo (vira a marrón tras incubación de 24 h en Acetamida y posterior adición del reactivo Nessler).

Burkholderia cepacia es el interferente principal, un Gram – no fermentador típico del agua, interferente porque a menudo aparece en CN en sólo 18-24h con colonias muy similares a las de *Pseudomonas aeruginosa*. En Rapid CN *Pseudomonas* Agar crece con colonias similares, pero de color rojo-púrpura. También son oxidasa positivas, pero no son fluorescentes y son ADH positivo (viran el tubo rojo a color amarillo o naranja tras 24h de incubación). Al ser también patógeno, no son trascendentes los falsos positivos debidos a ella y nos podríamos ahorrar la confirmación ADH.

Enterococcus faecalis es otra cepa interferente, un coco Gram positivo capaz de crecer en Agar CN con colonias pequeñas, en 24-48h. En Rapid CN *Pseudomonas* Agar crece también con colonias pequeñas, rojo intenso, en sólo 18-24h. Es 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.

Micrococcus luteopaisa es un aerobio Gram + típico del aire, contaminante habitual de medios, interferente porque a veces aparece en CN con colonias amarillas. En Rapid CN Pseudomonas Agar crece con colonias rojas. 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, nos conformamos con la componente repetitividad de la precisión. De modo que de cada botella saldrán 2 muestras teóricamente idénticas (réplicas) para el método estándar y otras 2 muestras teóricamente idénticas (réplicas) 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 lenticulas 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 solución salina marina al 0,9%.
- Realizamos los negros de inóculo directo en placas de 90 mm de ambos medios, para cada cepa, y por triplicado-cuadruplicado, 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 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)

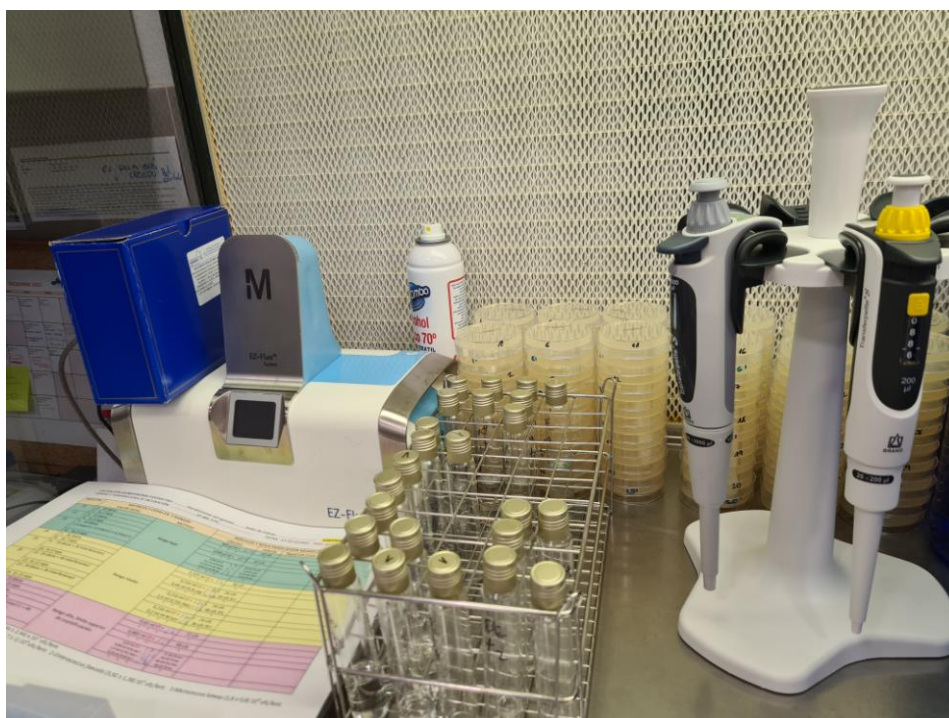
- Hacemos los cálculos para determinar la cantidad de inóculo que se deberá traspasar a cada botella de 1L (4 submuestras) para conseguir la cantidad aproximada de colonias que queremos en cada placa. Una vez determinado este valor, traspasamos dicho volumen de inóculo de cada cepa a las botellas con 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, para intentar separar lo más posible las ufc originales en células aisladas y que cada colonia proceda, lo más posible, de una sola célula.
- La concentración teórica de los distintos microorganismos inoculados en cada una de las 30 muestras se detalla en la “tabla del inóculos y resultados” anexada más adelante en el capítulo de resultados. Lo que se hizo con cada cepa fué:

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

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

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



Preparación de los inóculos y marcado de las placas

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 μl 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. Están plasmados en las tablas de resultados.

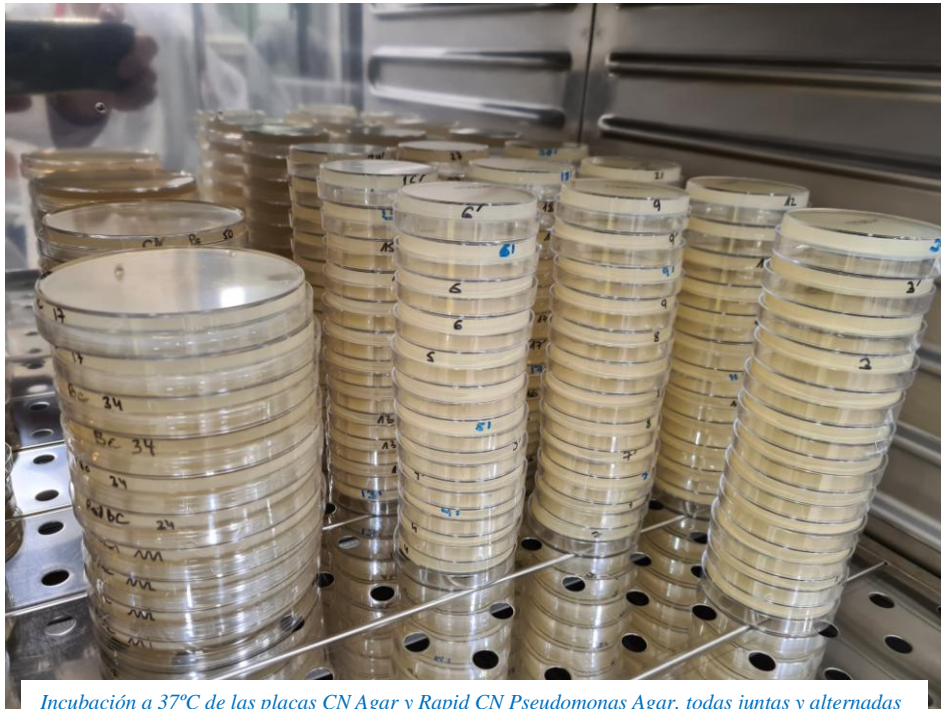
- Controles negativos para verificar que los medios empleados están estériles: A una de las muestras (la 1) no le añadimos ningún tipo de inóculo y será considerada como “muestra vacía” o blanco.
- Filtramos 250 mls de muestra por ensayo. La filtración se realiza con embudos de filtración estériles y filtros de membrana estériles. Se pone especial cuidado en esterilizar flameando con alcohol la base de cada embudo antes y después de cada filtración. 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 algunos microorganismos) y se coloca en la placa de cultivo adecuada de cada uno de los dos métodos de placa (CN Agar, Rapid CN Pseudomonas Agar).



Filtración con dos rampas de cada 4 réplicas de una misma muestra

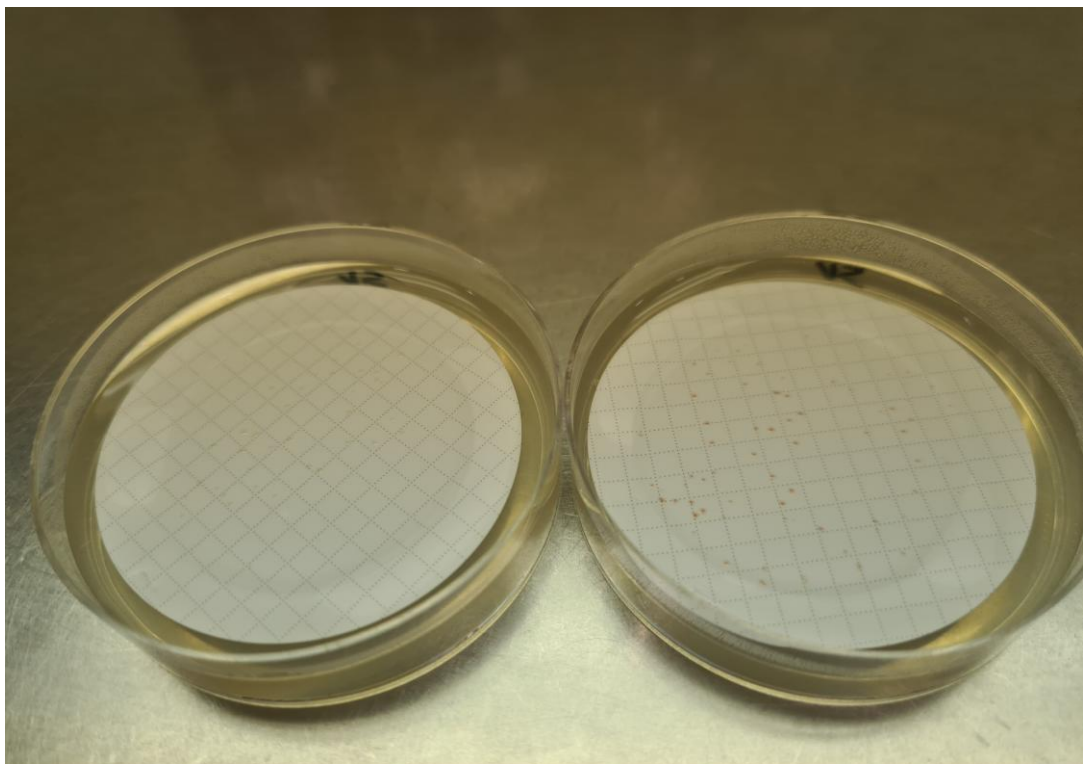
- Respetando al máximo los principios de precisión, para no añadir más incertidumbre a la innata en microbiología, en una de las dos rampas de 3 embudos, se anula uno de los 3 para dejar 2, y se inoculan siempre, para una misma muestra, los dos medios: mientras en la otra rampa se hace lo mismo para la réplica de muestras de la misma botella, también en ambos medios. Como una de las rampas permitía que el segundo embudo filtrase mucho más deprisa que el primero, se cambia desde la primera muestra el primer embudo, anulando este lento y se observa que el tercero sí filtra a la misma velocidad que el segundo.

- Todas las placas (incluidas las de los “negros”) se incuban juntas (para disminuir la imprecisión, se mezclan en pilas de 8 en secuencia: CN-Rapid-CN-Rapid-CN-Rapid-CN-Rapid) a 37°C durante 18-24 horas (concretamente 20 horas).



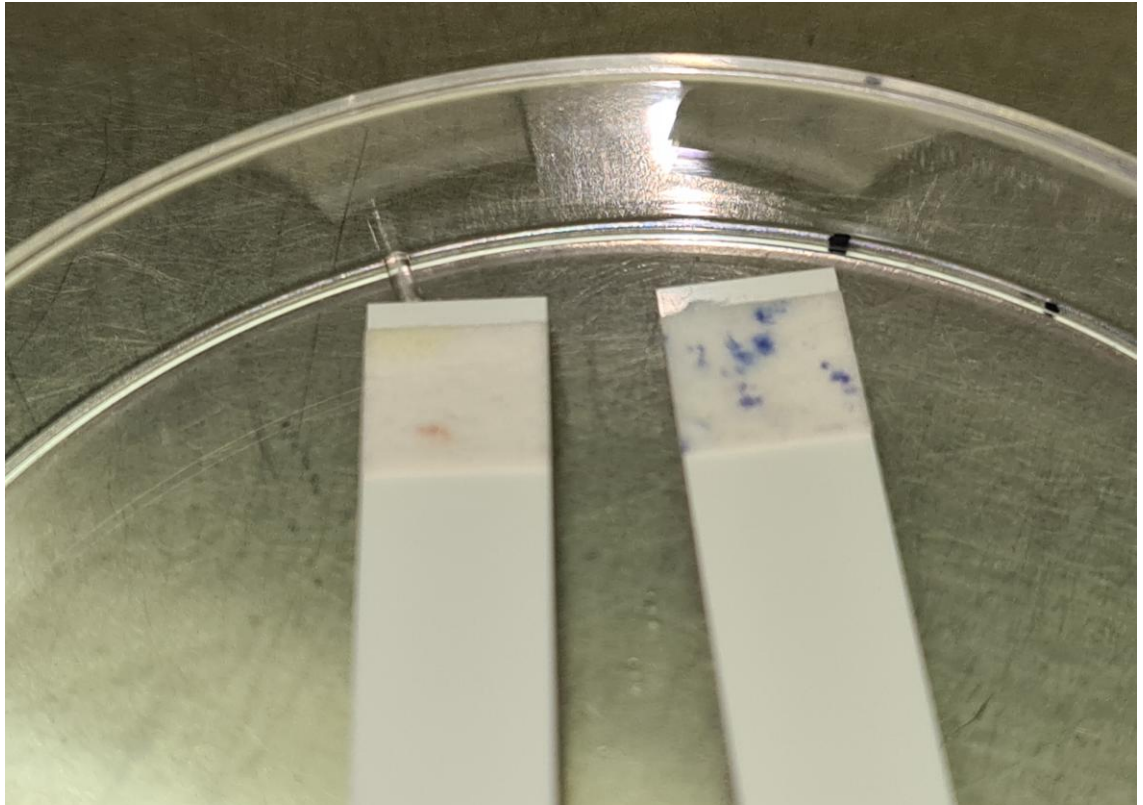
Incubación a 37°C de las placas CN Agar y Rapid CN Pseudomonas Agar, todas juntas y alternadas

- Transcurrido el tiempo de incubación se hace el conteo de las colonias sospechosas en cada una de las placas de cultivo. El recuento en Rapid CN Pseudomonas Agar a las 18-24h resulta sumamente cómodo, al ser colonias rosas o rojas que se ven perfectamente en contraste con el filtro blanco. Las placas de CN en 18-24h se pueden leer sólo bajo la luz intensa de la cabina y con gran dificultad, al ser planas, difusas y de un color similar al de la membrana.



Pseudomonas aeruginosa Izda: CN Agar tras 20 h de incubación. Dcha: Rapid CN Pseudomonas agar tras 20 h de incubación

- Si en el blanco (muestra 1) 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 oxidasa sobre las colonias para confirmar que se trata de *Pseudomonas aeruginosa* (oxidasa positiva: vira a azul) y no del *Enterococcus* o del *Micrococcus*



Izda: colonia del Enterococo o del Micrococo, Oxidasa negativas. Dcha: colonias de Pseudomonas aeruginosa, Oxidasa positivas,

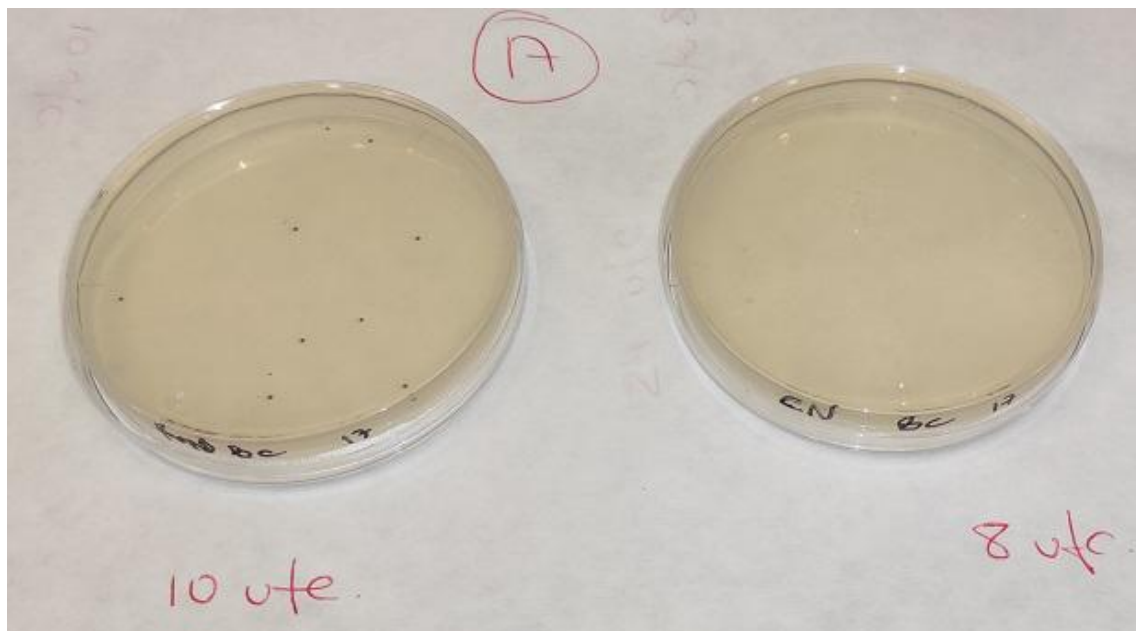
- Se realiza el test ADH sobre las colonias y se incuba 24 h para confirmar que son de *Pseudomonas aeruginosa* (ADH negativa: se mantiene rojo) y no de *Burkholderia* (ADH positiva: vira de rojo a amarillo o naranja)
- Se realiza el test Acetamida sobre las colonias y se incuba 24 h para confirmar que son de *Pseudomonas aeruginosa* (Acetamida +, vira a marrón tras añadir unas gotas de reactivo Nessler)



3 tubos rojos de ADH: Las colonias que allí se sembraron no son de Burkholderia. . Tubos incoloros de Acetamida: Las colonias sembradas no son de Pseudomonas aeruginosa. Tubo marrón de Acetamida: se trata de Pseudomonas aeruginosa

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 (CN, Rapid CN Pseudomonas Agar) para la cepa diana y las interferentes y acompañantes), SIN USAR NI EL MÉTODO DE ANÁLISIS NI LAS MUESTRAS, sembrando directamente las lenticulas 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 triplicado de placas. Se emplean para estos negros, placas de 90 mm para evitar que, como en anteriores validaciones, el asa Digrasky 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



Uno de los negros a las 20 h de incubación, Izda en Rapid CN Pseudomonas Agar (10 colonias muy evidentes), Dcha en CN (8 colonias muy mal distinguibles)

estériles. En las cepas interferentes no hace falta recuento, sólo se siembra en estria 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 la muestra 1.

Lectura de los negros previos a la validación (valor actual respecto al valor esperado certificado de la cepa) en placa de 60 mm de CN de la marca habitual usada por el laboratorio:

Cepa y concentración teórica ufc/placa	Valor teórico según CCC de la cepa	Nº colonias obtenidas CN Agar (triplicado)	Propuesta A de valor corregido (según cepa diana)
Diana <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55 ufcs	14 colonias 12 colonias 10 colonias	Media reducción sin filtrar Se obtiene el 21,82% del valor inoculado

Con este valor se rehacen los cálculos para elaborar los inóculos el día de la validación (ver tabla de inóculos y resultados).

Los negros obtenidos el día de la validación en placa de 90 mm de CN y de Rapid CN de MICROKIT son:

Cepa y concentración teórica ufc/placa	Valor teórico según CCC de la cepa	Nº colonias obtenidas CN Agar (triplicado)	Nº colonias obtenidas Rapid CN
Diana <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50 ufcs	49 colonias 56 colonias 52 colonias Media: 52 colonias (104% del inóculo)	51 colonias 61 colonias 57 colonias Media: 56 colonias (112% del inóculo)
	100 ufcs	70 colonias 68 colonias Media: 69 colonias (69% del inóculo)	82 colonias 84 colonias Media: 83 colonias (83% del inóculo)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Muy elevado	No crece	No crece
<i>Enterococcus faecalis</i>	Muy elevado	Crece con colonias pequeñas de color crema	Crece con colonias pequeñas de color rojo muy intenso
<i>Micrococcus luteopaisa</i>	Muy elevado	Crece con colonias de color crema	Crece con colonias de color rosa-rojo

De modo que no habría que haber recalculado los inóculos, si los negros iniciales se hubieran hecho en placa de 90 mm de marca Microkit, donde no hay reducción del valor teórico en el rango medio de recuento (50 ufc/placa) y la reducción es muy inferior en el rango alto (100 ufc/placa) de recuento (se obtiene el 69%-83%, en vez del 21,82% del valor inoculado). Este recálculo, al fiarnos de los resultados de los negros iniciales, trae consigo la obtención en la presente validación, de resultados con recuentos muy superiores a los esperados, de modo que no conseguimos recuentos en el rango bajo.

Se demuestra la correcta estabilidad de las lenticulas empleadas, al mantenerse no sólo el log inicial, sino valores entre el 69% y el 112%. Si la bajada hubiera sido más importante respecto al valor certificado de las cepas, habría que aplicar un factor de corrección acorde al % de reducción calculado en las dianas. Si hubiese sido 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. 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, sacado de la química, para trabajar bajo él en microbiología.

Otra conclusión es que en los negros previos a la validación, destinados a hacer mejor los cálculos de los inóculos, debe emplearse el medio de la misma marca que se desea validar, y en placa de 90 mm para mejor reparto de las ufc/placa. En la presente, al emplear medios de calidad inferior y en placa de 60 mm, que obtenían una reducción a casi 1/5 del valor inóculo, los cálculos de los inóculos finales se han hecho 5 veces por encima de la realidad, de modo que se han desplazado todos los resultados hacia el rango alto y no se obtienen recuentos en los rangos bajos (ej: valor teórico calculado 10 ufc/placa, valor real conseguido 50 ufc/placa): el mínimo de colonias/placa conseguido es de 23 (y en los cálculos de los límites de cuantificación, de 7 colonias/placa)

Se evidencia ya desde los simples negros, la **mayor fiabilidad del medio Rapid CN Pseudomonas Agar con respecto al CN Agar**, ya que detecta un 83-112% del valor inóculo, frente al 69-104% que recupera el CN, lo que implica un 108-120% de exactitud el medio rápido por encima del medio estándar. 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 Rapid CN Pseudomonas Agar puede llegar a conseguir una exactitud superior a la del CN. Por todo ello, no aplicaremos factores de corrección en los cálculos, aunque sí que los hayamos aplicado (por prudencia antes de la validación) en el cálculo de los inóculos.

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 con respecto al medio estándar 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 Rapid CN Pseudomonas Agar recupere como mínimo el 50% del valor conseguido por el CN; como ideal el 70%; y como excelente el 90% o más, como ha sido el caso, al superar el 100%.

7. Resultados

Se observa una enorme similitud entre los 2 métodos comparados, aunque el Rapid CN Pseudomonas Agar duplica la velocidad de lectura del CN Agar

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, 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 un frasco de 250 ml con 250 ufc, jamás conseguiremos que haya 1 ufc/mL.

Se detecta un mejor comportamiento del Rapid CN Pseudomonas Agar con respecto al CN Agar, no sólo en rapidez duplicada, sino en los recuentos obtenidos: En el rango bajo, 139% más colonias en el primero, en el rango medio 161% más colonias en el primero y en el alto no se puede contabilizar al salir en ambos métodos en todas las placas de rango alto, colonias incontables. Ya hemos explicado que esto se debe a la corrección en los cálculos que hicimos a causa de la bajada de los negros previa a la validación a causa del tamaño y marca del medio CN Agar empleado, corrección que luego no se correspondió con la realidad con la validación, de modo que todas las ufcs sembradas se vieron desplazadas hacia arriba (en los 3 rangos).

Afortunadamente en la búsqueda de los límites de cuantificación, conseguimos desde 7 hasta 108 colonias/placa, por lo que la validación sigue siendo adecuada.

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO:*Pseudomonas aeruginosa*..... **NEGATIVOS**
 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 20h y 48h a 37°C FECHA: 13-15/XII/2021

BOTELLA	MATRICES Y CEPAS EN 3 RANGOS			INÓCULOS Y RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS				
	VALOR EJEMPLO	MOTIVO	VALOR REAL	Cálculos/placa	Inóculo/L	Rapid CN 20h	CN 20h	CN 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+11 interferente1	Falsos positivos (exclusividad)	+	0,2 ml t4 = 11 ufc B.cep	0,8 mL t4	0	0	20
	4: Es 3 repe		+	“ ” ”	“	0	0	21
3	5: 0 diana+12 interferente 2		+	0,6 ml t2 = 12 ufc Etc. faec	0,24 mL t3	6 rojo oscuro	0	0
	6: Es 5 repe		+	“ ” ”	“	0	0	0
4	7: 0 diana+18 interferente 3		+	0,1 ml t4 = 18 ufc M.lut	0,4 mL t4	2 rojo oscuro	0	0
	8: Es 7 repe		+	“ ” ”	“	2 rojo oscuro	0	0
5	9: 0 diana+66 interferente1		+	1,2 ml t4 = 66 ufc B.cep	4,8 mL t4	0	0	60
	10: Es 9 repe		+	“ ” ”	“	0	0	63
6	11: 0 diana+72 interferente2		+	3,6 ml t2 = 72 ufc Etc.faec	1,44 mL t3	5 rojo oscuro	0	3
	12: Es 11 repe		+	“ ” ”	“	13 rojo oscuro	0	5
7	13: 0 diana+108 interferente3	+	0,6 ml t4 = 108 ufc M.lut.	0,24 mL t3	0	0	0	
	14: Es 13 repe	+	“ ” ”	“	0	0	1	
8	15: 0 diana+110 interferente1	+	2 ml t4 = 110 ufc B.cep	1 mL t3	0	0	53	
	16: Es 15 repe	+	“ ” ”	“	0	0	43	
9	17: 0 diana+120 interferente2	+	6 ml t2 = 120 ufc Etc.faec	0,33 mL t3	6 rojo oscuro	0	0	
	18: Es 17 repe	+	“ ” ”	“	8 rojo oscuro	0	0	
10	19: 0 diana+180 interferente3	+	1 ml t4 = 180 ufc M.lut	0,33 mL t3	2 rojo oscuro	0	0	
	20: Es 19 repe	+	“ ” ”	“	4 rojo oscuro	0	1	

Interferentes: 1 *B.cepacia* ATCC 25416 $(1,7 \pm 1,0) \times 10^8$, 2 *Etc. faecalis* WDCM00087 $(1,72 \pm 0,52) \times 10^5$, 3 *M.paisa* CCCTM12 $(1,8 \pm 0,8) \times 10^8$

Notas e incidencias: Los interferentes se distinguen en Rapid CN Pseudomonas Agar por ser colonias de color rojo oscuro (púrpura, vino tinto), en vez de rosas, en la lectura a las 18-24h. En CN Agar no se distinguen a simple vista y tocaría confirmar oxidasa, ADH y Acetamida/Nessler a cada colonia que saliera en los análisis rutinarios para evitar los falsos positivos (aunque lógicamente también se haría por precaución en Rapid CN Pseudomonas Agar). Pero lo peor del método estándar viene aquí: Falsos positivos (distinguibles a simple vista) en Rapid CN Pseudomonas Agar: 48 colonias; falsos positivos (no distinguibles a simple vista) en CN Agar: 270 colonias (5,6 veces más que nos harían perder tiempo en un 560% de más muestras y un día más en confirmaciones en todas ellas). De cada 100 falsos positivos en CN Agar, sólo hay 17 falsos positivos en Rapid CN Pseudomonas Agar. No se lee el Rapid CN a las 48h porque no es su función.

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO: *Pseudomonas aeruginosa*
 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 20h y 48h a 37°C

LIMITES DE CUANTIFICACIÓN

FECHA: 13-15/XII/2021

BOTELLA	MATRICES Y CEPAS EN 3 RANGOS		INÓCULOS Y RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS				
	VALOR IDEAL:	MOTIVO:	Cálculos/placa	Inóculo/L	Rapid CN 20h	CN 20h	CN 48h
11	1: 3 ufc diana1	Límites cuantificación	262 µl t4 = 1048	3 ufc	10 rosas	7 muy tenues	25 verdes
	2: Es 1 repe		“ ” ”	“	15 rosas	8 muy tenues	14 verdes
12	3: 4 ufc diana2		350 µl t4 = 1400	4 ufc	19 rosas	29 muy tenues	29 verdes
	4: Es 3 repe		“ ” ”	“	14 rosas	17 muy tenues	51 verdes
13	5: 5 ufc diana 1		450 µl t4 = 1800	5 ufc	36 rosas	26 muy tenues	49 verdes
	6: Es 5 repe		“ ” ”	“	40 rosas	24 muy tenues	38 verdes
14	7: 6 ufc diana 2		550 µl t4 = 2200	6 ufc	48 rosas	35 muy tenues	incontables
	8: Es 7 repe		“ ” ”	“	57 rosas	34 muy tenues	incontables
15	9: 7 ufc diana 1		635 µl t4 = 2540	7 ufc	54 rosas	30 muy tenues	incontables
	10: Es 9 repe		“ ” ”	“	23 rosas	34 muy tenues	incontables
16	11: 8 ufc diana 2		725 µl t4 = 2900	8 ufc	21 rosas	19 muy tenues	incontables
	12: Es 11 repe		“ ” ”	“	23 rosas	24 muy tenues	incontables
17	13: 27 ufc diana 1		246 µl t3 = 948	27 ufc	96 rosas	72 muy tenues	incontables
	14: Es 13 repe		“ ” ”	“	108 rosas	74 muy tenues	incontables
18	15: 54 ufc diana 2		492 µl t3 = 1968	54 ufc	incontables	incontables	incontables
	16: Es 15 repe		“ ” ”	“	incontables	incontables	incontables
19	17: 108 ufc diana 1		985 µl t3 = 3940	108 ufc	incontables	incontables	incontables
	18: Es 17 repe		“ ” ”	“	No se ve nada	incontables	incontables
20	19: 162 ufc diana 2		1475 µl t3 = 5900	162 ufc	incontables	incontables	incontables
	20: Es 19 repe		“ ” ”	“	incontables	incontables	incontables

Diana: 1 *Pseudomonas aeruginosa* WDCM00025 (5,54 ± 2,44) x10⁷

Interferentes: 1 *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (1,7 ± 1,0) x 10⁸, 2 *Enterococcus faecalis* WDCM00087 (1,72 ± 0,52) x 10⁵, 3 *Micrococcus paisa* CCCTM12 (1,8 ± 0,8) x 10⁸

Notas e incidencias: En 20h en CN Agar son casi indetectables (crema sobre fondo blanco) y sólo bajo luz intensa de la cabina, mientras en Rapid CN *Pseudomonas* Agar son muy evidentes (blancas con centro rosa intenso, casi fucsia).

En 48h en CN Agar son verdes y se recupera casi el doble que en 20 h (206 colonias frente a 111 en CN, 186%) y a 134 en Rapid CN *Pseudomonas* Agar). 134/206 está por encima del 50% necesario para dar por válido un medio selectivo. Y 134/111 (y 564/433) es un valor mejor en 20 h (121% y 130%) para Rapid CN Agar respecto a CN Agar.

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: *Pseudomonas aeruginosa* **POSITIVOS**
 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 20h y 48h a 37°C FECHA: 13-15/XII/2021

BOTELLA	MATRICES Y CEPAS EN 3 RANGOS		INÓCULOS Y RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS					
	VALOR IDEAL:	MOTIVO:	Cálculos/placa	Inóculo/L	Rapid CN 20h	CN 20h	CN 48h	
21	1: 10 diana	Rango bajo	900 µl t4 =	10 ufc	36 salmón	23 muy tenues	Incontables 43*	
	2: Es 1 repe		“ ” ”	“	70 rosas	50 muy tenues	Incontables 93*	
22	3: 15 diana		1200 µl t4 =	15 ufc	112 rosas	60 muy tenues	Incontables 112*	
	4: Es 3 repe		“ ” ”	“	62 rosas	57 muy tenues	Incontables 106*	
23	5: 10 diana + 5 interf 1 + 6 interf 2 + 6 interf 3		0,90 ml t4	10 ufc Ps.aer	57 rosas y 5 rojas	32 muy tenues	Incontables 60*	
	6: Es 5 repe		0,1 ml t4 B.cep 0,3 ml t2 Etc.faec 0,03 ml t4 M.lut	5 ufc B.cep 6 ufc Etc.fae 6 ufc M.lut	“ ” ”	“	28 rosas y 2 rojas	40 muy tenues
24	7: 36 diana		Rango medio	0,325 ml t3 =	36 ufc	Incontables rojas	Incontables crema	Incontables
	8: Es 7 repe			“ ” ”	“	50 rosas	60 muy tenues	Incontables 112*
25	9: 24 diana + 20 interferente1			0,216 ml t3 =	24 ufc	29 rosas	40 muy tenues	Incontables 74*
	10: Es 9 repe			0,44 ml t4 B.cep =	20 ufc B.cep	“ ” ”	“	49 rosas y 29 rojas
26	11: 24 diana + 48 interferente2	0,216 ml t3 =		24 ufc	110 rosas y 12 rojas	62 muy tenues	Incontables 115*	
	12: Es 11 repe	2,4 ml t2 Etc.faec =		48 ufc Etc.fae	“ ” ”	“	130 rosas	70 muy tenues
27	13: 24 diana + 36 interferente3	0,216 ml t3 =		24 ufc	180 rosas	90 muy tenues	Incontables 167*	
	14: Es 13 repe	0,2 ml t4 M.lut=		36 ufc M.lut	“ ” ”	“	110 rosas y 12 rojas	62 muy tenues
28	15: 72 diana	Rango alto, límite superior de cuantificación		0,65 ml t3 =	72 ufc	Incontables rojas	Membrana crema	Incontables
	16: Es 15 repe			“ ” ”	“	Incontables rojas	Membrana crema	Incontables
29	17: 98 diana		0,885 ml t3 =	98 ufc	Incontables rojas	Membrana crema	Incontables	
	18: Es 17 repe		“ ” ”	“	Incontables rojas	Membrana crema	Incontables	
30	19: 72 diana + 40 interf 1 + 48 interf 2 + 48 interf 3		0,65 ml t3 =	72 ufc Ps.aer	Incontables rojas	Membrana crema	Incontables	
	20: Es 19 repe		0,88 ml t4 B.cep = 2,4 ml t2 Etc.faec = 0,24 ml t4 M.lut =	40 ufc B.cep 48 ufc Etc.fae 48 ufc M.lut	“ ” ”	“	Incontables rojas	Membrana crema

Diana: 1 *Pseudomonas aeruginosa* WDCM00025 ($5,54 \pm 2,44$) x 10^7

Interferentes: 1 *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 ($1,7 \pm 1,0$) x 10^8 , 2 *Enterococcus faecalis* WDCM00087 ($1,72 \pm 0,52$) x 10^5 , 3 *Micrococcus paisa* CCCTM12 ($1,8 \pm 0,8$) x 10^8

Notas e incidencias: El desplazamiento de los inóculos x5 debido a la corrección causada por los negros previos, hace que los recuentos sean más altos de lo deseado en los 3 rangos (numerosos incontables). En 20 h en CN Agar las colonias son casi imperceptibles, excepto en los recuentos muy altos, en los que la membrana vira a crema-amarillo; mientras en Rapid CN *Pseudomonas* Agar se ven perfectamente gracias a su color rosa o salmón.

*En 48 h todas las placas de CN Agar se han declarado incontables, por lo que aplicamos el ratio 186% del recuento CN Agar 48h/20h (obtenido en la tabla de los límites de cuantificación) para establecer un recuento numérico de las placas de CN Agar a las 48h.

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 midiendo 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, en la evaluación previa a la validación en placas de 60 mm de otra marca de CN Agar, han bajado al 21,82% en la diana *P.aeruginosa*. En cambio durante la validación, al comparar el valor certificado de la cepa con placas de 90 mm, en CN Agar de Microkit han recuperado en el rango medio un 104% y en el rango alto un 69%; y en Rapid CN Pseudomonas Agar de Microkit, han recuperado en el rango medio un 112% y en el rango alto un 83%; siguen siendo modificaciones 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 es al menos igual de efectivo que el método estándar, 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 consensado 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 *Pseudomonas aeruginosa*, 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). Se considera generalmente rango bajo el de menos de 30-50 colonias/placa, el medio entre 50 y 100 colonias/placa y el alto el de más de 100 colonias/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.
- **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 Pseudomonas aeruginosa* 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, 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 *Pseudomonas aeruginosa* 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 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 *Pseudomonas aeruginosa* 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. Queda un largo camino por recorrer para que se empleen los mejores métodos de forma oficial.

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 7-10 ufc/250 mL en el rango bajo, 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 3-8 ufc/250 mL porque en la mayoría de validaciones más estrictas, se demuestra la capacidad de encontrar 6 ufc, pero la corrección en los cálculos causada por la enorme bajada de los negros previos, nos ha jugado una mala pasada y ha provocado un corrimiento de los recuentos al alza en los 3 rangos en esta validación.

En cuanto al límite superior de cuantificación, inoculamos un máximo calculado de 162 ufc/250 mL, pero en realidad estábamos inoculando 5 veces más, por lo que esas placas han sido realmente incontables. Eso no significa que no seamos capaces de detectar valores más cercanos al 150 ufc/250 mL sólo significa que tampoco hemos conseguido inóculos que realmente tuvieran 150 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 *Pseudomonas aeruginosa* cuando están presentes; nos han convertido por Ley un método cualitativo: “no debe haber ni una sola célula de *Pseudomonas aeruginosa* en 250 mL de muestra” es decir “debe haber 0 o ausencia”; en un método cuantitativo: “cuenta cuantos hay y si hay más de cero, el lote no es válido”

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 podremos calcular la recuperación absoluta, comparando el recuento en Rapid CN *Pseudomonas* Agar en 20 horas, con respecto al recuento en CN Agar en 48 horas, 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 veces confiamos más en el criterio de la recuperación relativa.

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, pero a haber tantos valores incontables en la tabla de positivos, también nos serviremos de ella para obtener más valores que comparar.

▪ 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:

-CN Agar a sus 48 horas: Las recuperaciones medias respecto al valor inóculo son, en las muestras aprovechables para límite de detección y revirtiendo (x5) el cálculo de los negros (206 colonias/120 ufc = 172%); en las muestras aprovechables positivas, 1.339 colonias/1.430 ufc = 93,64%)

-Rapid CN Pseudomonas Agar: Las recuperaciones medias respecto al valor inóculo son, en las muestras aprovechables para límite de detección y revirtiendo (x5) el cálculo de los negros (433 colonias/564 ufc = 76,77%); en las muestras aprovechables positivas, 1.023 colonias/1.430 ufc = 71,54%); de modo que la recuperación relativa respecto al valor inóculo supera en sólo 20 h el 70% aplicable en medios selectivos y por supuesto el 50% aplicable en validaciones de menor exigencia.

Deben considerarse método equivalentes en cuanto a exactitud, aunque el Rapid CN Pseudomonas Agar da los resultados en 18-24 h mientras el clásico CN Agar tarda 48 h.

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 superior a 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 ayudan a aceptar el método rápido frente al estándar.

En cuanto a la recuperación absoluta del Rapid CN Pseudomonas Agar en 18-24 h con respecto al método estándar CN Agar en 48 h:

- 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 Rapid CN Pseudomonas Agar con respecto el CN Agar (aprovechamos que en CN pudimos ver colonias a las 20h y comparamos también):

Medio	Exactitud medida como recuperación absoluta
Rapid CN 20h/ CN 20h en tabla positivas	1.023 colonias/720 colonias = 142 %
Rapid CN 20h/ CN 48h en tabla positivas	1.023 colonias/1.339 colonias = 76,40 %
Rapid CN 20h/ CN 20h en tabla límites cuantif.	134 colonias/111 colonias = 121%
Rapid CN 20h/ CN 48h en tabla límites cuantif.	134 colonias/206 colonias = 65,05 %

El Rapid CN Pseudomonas Agar recupera en sólo 20 h, un 142 % con respecto al método CN Agar de 20h y un 76,40 % respecto al método oficial CN Agar de 48h, lo cual concuerda con otras validaciones de este mismo método rápido, donde el Rapid CN Pseudomonas Agar siempre obtiene en la mitad de tiempo resultados adecuados (>50%), óptimos (>70%) e incluso, si se desea, **son resultados fácilmente extrapolables a los obtenidos en 48 h con CN Agar, aplicando un factor de corrección que resulta de dividir por 0,76 el número de colonias obtenidas en 18-24 horas en Rapid CN Pseudomonas Agar, para calcular el número de colonias que obtendríamos en 48 horas en Agar CN.** Por ejemplo, si obtenemos 7 colonias en Rapid CN Pseudomonas Agar en 18-24 horas, lo dividimos por 0,76 y obtendremos un valor calculado de 9 colonias en CN Agar en 48 horas; si obtenemos 23 colonias en Rapid CN Pseudomonas Agar en 18-24 horas, lo dividimos por 0,76 y obtendremos un valor calculado de 30 colonias en CN Agar en 48 horas; si obtenemos 55 colonias en Rapid CN Pseudomonas Agar en 18-24 horas, lo dividimos por 0,76 y obtendremos un valor calculado de 72 colonias en CN Agar en 48 horas... Tampoco es necesario cuando la legislación exige 0 ufc/250 mL, de modo que nos da igual que haya 55 que 72 colonias, en ninguno de los dos casos la muestra sería válida.

No podemos hacer la comparativa en cada uno de los 3 rangos de recuento en placa por los motivos ya comentados sobre los inóculos exagerados x5 a causa de los negros previos en placa de 60 mm de CN Agar de una marca que no es MICROKIT y habían bajado al 20% con respecto a la cepa diana, que realmente estaba bien, como se ha demostrado con los negros durante la validación, en placa de 90 mm de medio CN Agar (y también en medio Rapid CN Pseudomonas Agar) de marca MICROKIT.

Lo que sí podemos hacer, gracias a la tabla de los límites de cuantificación, es observar que para los recuentos más bajos conseguidos (3 ufc que en realidad eran 15 a causa de la corrección de los negros previos), tanto el Rapid CN Pseudomonas Agar en 18-24 horas como el CN Agar en 48 h, detectan adecuadamente con 10-15 y 25-14 colonias respectivamente. Y así en todos los inóculos mínimos.

Concluimos ante ambas formas de medir la exactitud (relativa y absoluta), cuyos resultados han sido idénticos, que el medio que mejor se comporta ha sido el Rapid CN Pseudomonas Agar, al recuperar en sólo 20h más del 70% de rigor que el CN Agar en 48h.

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 CN-20h por ser un método que no era objeto de esta validación y además, que se hayan visto colonias en sólo 20h en este medio no es lo normal en muestras naturales. Calcularemos la precisión del Rapid CN Pseudomonas Agar-20h y del CN Agar-48h 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 **Rapid CN Pseudomonas Agar** en 20h en los **pares** de muestras idénticas

Rango de Medida	Tabla positivos $X_{21} - X_{30}$	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
10-15 ufc/250 mL	36,70 112,62 57,28	24 35,35 20,5	45% 40,63% 116,47%
24-36 ufc/250mL	29,49 110-130, 180,110	14,14 14,14 49,5	36,25% 11,78% 34,14%
72-98 ufc/250mL	Incontables todos	-	-
Precisión media en todos los rangos			47,38%

▪ Precisión en CN Agar en 48h en los pares de muestras idénticas

Rango de Medida	Tabla positivos $X_{21} - X_{30}$	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
10-15 ufc/250 mL	43,93 112,106 60,74	35,35 4,24 9,9	51,98% 3,89% 14,77%
24-36 ufc/250mL	74,138 115,130 167,115	45,25 10,61 36,77	42,69% 8,66% 26,08%
72-98 ufc/250mL	Incontables todos	-	-
Precisión media en todos los rangos			24,67 %

Como es lógico, la precisión no depende del medio, aunque ha salido muy diferente entre ambos

No estudiamos la precisión en cada rango, porque el corrimiento al alza en los recuentos, causada por el factor de corrección aplicado en los cálculos a raíz de los negros previos a la validación, nos han hecho estar en casi todas las muestras, en rangos altos e incluso en muchos muy altos (incontables).

▪ Comentarios

La menor precisión (mayor CV %) se suele dar en todos los medios en el rango de recuento más bajo, como es lógico a causa de la incertidumbre del reparto de inóculo en los tubos de diluciones más bajas.

Una precisión inferior al 25% (como la obtenida en CN Agar en 48 h) es la cumbre de la excelencia en precisión microbiológica.

Una precisión inferior al 50% (como la obtenida en Rapid CN Pseudomonas Agar en 20 h) es el siguiente baremo de excelencia en precisión microbiológica.

En general, la precisión depende mucho más del rango de recuento 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/100 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 Rapid CN Pseudomonas Agar en 20 h:

Rango de Medida	Rtos. medios
10-15 ufc/250 mL (en realidad 50-75)	61 colonias/placa
24-36 ufc/250mL (en realidad 120-180)	94 colonias/placa
72-98 ufc/250mL (en realidad 360-490)	incontables colonias/placa

En CN Agar en 48h:

Rango de Medida	Rtos. medios
10-15 ufc/250 mL (en realidad 50-75)	81 colonias/placa
24-36 ufc/250mL (en realidad 120-180)	122 colonias/placa
72-98 ufc/250mL (en realidad 360-490)	incontables colonias/placa

La linealidad del recuento en ambos métodos queda demostrada.

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 (a ser posible, 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. Se demuestra así la selectividad inclusiva del 100% para los dos métodos.

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 rojo intenso en vez de rosas (incoloras con el centro

fucsia). Se demuestra así la especificidad exclusiva del 100% para el método Rapid CN Pseudomonas Agar. El método CN Agar 20h no es capaz de diferenciar las colonias diana de las interferentes, pero esperando a su incubación oficial de 48h sí, al ser sólo Pseudomonas la que tiene colonias verdes y fluorescentes; por tanto el método estándar CN Agar 48 h también demuestra una especificidad exclusiva del 100%, aunque sólo en la incubación a 48h.

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

El Rapid CN Pseudomonas Agar recupera en 20h un 76,40 % respecto al CN Agar en 48h, lo cual debe considerarse muy similar en microbiología, ya que ni siquiera está por debajo del 50%.

Diferente hubiera sido comparar con los recuentos obtenidos en la otra marca de CN Agar con la que se hicieron los negros previos a la validación, como quedó demostrado en su reducción del valor inóculo al 21,82%, lo cual no ha ocurrido con los dos medios MICROKIT, que han estado muy cercanos al valor inóculo tanto en los negros como en todos los datos obtenidos en la validación.

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 que hablan de algo tan poco concreto taxonómicamente como "Enterococos fecales" o "Enterobacterias" o "Salmonella", analizamos con varias de las dianas más comunes que aparecen en la ISO 11133, no solo una.

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.

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 de cepas ambos métodos.

6-Employar 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 Streptococos 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 burbujan 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) 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 relativa del 71,54 (rangos bajos) y del 76,77% (todos los rangos) del método Rapid CN Pseudomonas Agar 18-24h con respecto al inóculo diana es excelente, superior al 50% e incluso al 70% de los estándares microbiológicos.

La exactitud absoluta del método Rapid CN Pseudomonas Agar 18-24h respecto al medio oficial CN Agar 48h es excelente: 76,40 %

La precisión medida como CV %, no llega a un nivel inadmisibles del 90%, por lo que cumple el criterio de aceptabilidad en ambos medios, para los que siempre se mantiene por debajo del 70%, incluso del 50% (y en CN Agar incluso del 25%).

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

Por todo ello, se considera validado el parámetro de recuento de *Pseudomonas aeruginosa* en nuestras muestras con el método de recuento rápido Rapid Pseudomonas Agar 20h, de modo que podemos usarlo desde el mismo instante en que firmemos este informe.

La peor opción es la oficial (CN Agar), al suponer más trabajo, el doble de tiempo (lecturas a las 48 horas) y resultados que no mejoran en absoluto el método que hemos validado. A lo sumo, podemos aplicar el factor de corrección de dividir por 0,76 el número de colonias obtenidas a las 18-24 h de incubación en Rapid CN Pseudomonas Agar, para obtener el número estimado de colonias en 48 h en CN Agar; aunque no tiene mucho sentido cuando buscamos que en nuestras muestras haya 0 ufc/250 mL, de modo que nos da igual que haya 7 ó 9 ufc/250 mL o que haya 23 ó 30 ufc/250 mL: en todos los casos, la muestra no sería aprobada.

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" 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 personal analítico, cambio de medios de cultivo o de casa comercial aunque declaren fabricar la misma fórmula del medio (como ha quedado claramente patente en la presente validación y los negros previos), cambios de equipos relevantes, cambios de tipo de membranas filtrantes, cambio de tipos de muestras, cambio del procedimiento...

10. Bibliografía

- *Guía para la validación de ensayos microbiológicos y ejemplos de protocolos*. MICROKIT, 2006
- UNE-EN-ISO 16266, Detección y recuento de *Pseudomonas aeruginosa* en aguas.
- 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) que no están ya insertadas en el informe
- 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:

Responsable del laboratorio de microbiología:

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

23 de Diciembre de 2021

ANEXO 1

Estudio de las Posibles causas de aparición de resultados anómalos

La supuesta bajada de los recuentos de las dianas obtenida en los negros previos, al usar medios de cultivo de marcas diferentes a la de la validación, nos enseña que no podemos volver a emplear medios diferentes en ningún paso de la validación. Hemos multiplicado por 5 los resultados de los cálculos de los inóculos y eso, al no ser real la bajada al 20% de los valores de las cepas, nos ha hecho desplazar toda la validación al rango alto y muy alto. Aunque sea 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) y una de las causas es precisamente la marca de medio empleada por cada participante, no deja de ser chocante. Aún así la validación es correcta y útil para demostrar que el método rápido es adecuado.

ANEXO 2

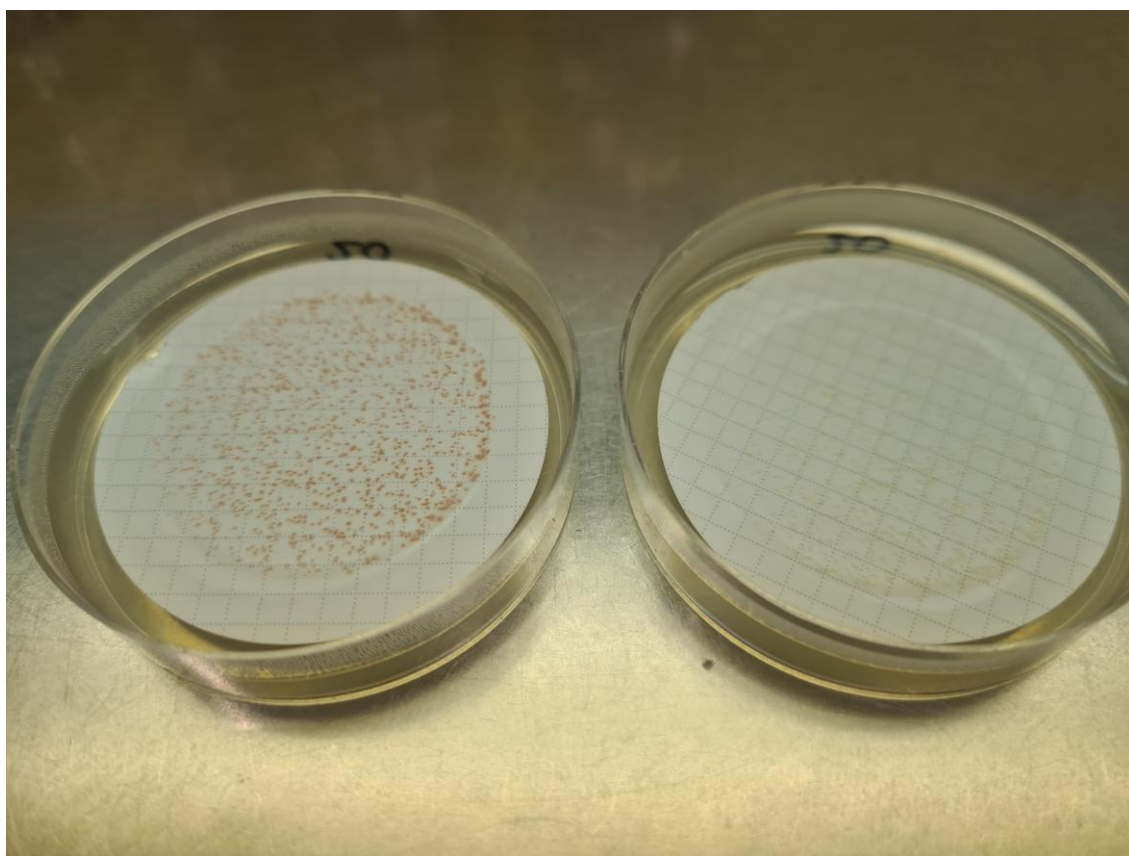
Propuestas de mejora para próximas validaciones

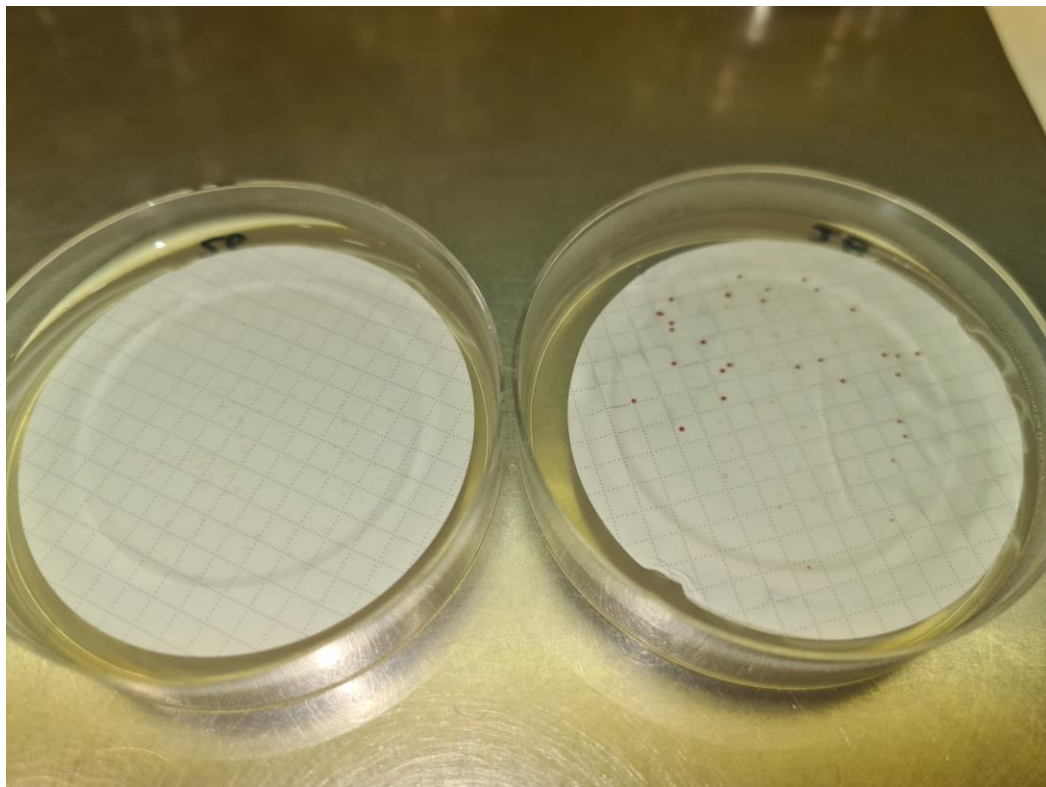
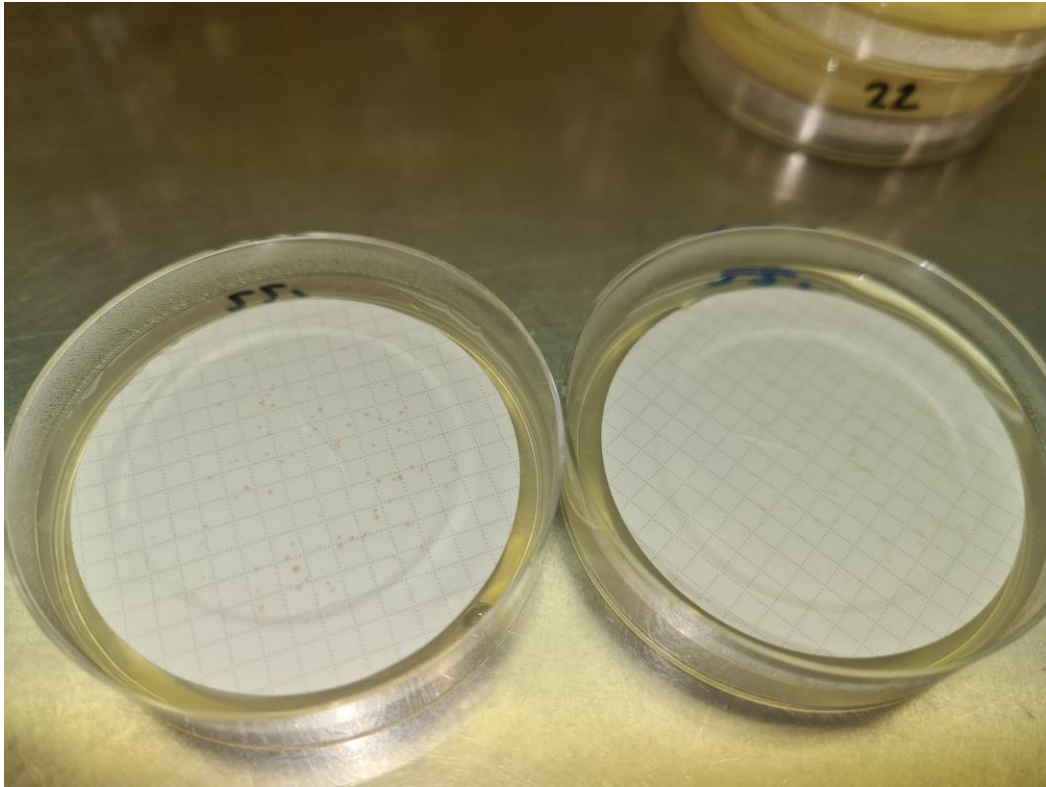
No volver a usar medios de otras marcas en el paso previo a la validación del cálculo actual de los valores inóculo, para evitar obtener valores erróneos en los negros que podrían llegar a llevarse al traste toda la validación.

ANEXO 3

Fotografías de la validación no anexadas en el texto

Otras placas comparadas de Rapid CN Pseudomonas Agar y CN Agar a las 20 horas de incubación





ANEXO 4

Certificados de control de calidad de los medios, kits y cepas utilizados

Ver aparte