

INFORME DE VALIDACION CUANTITATIVA QUANTI-PA-CP EN 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

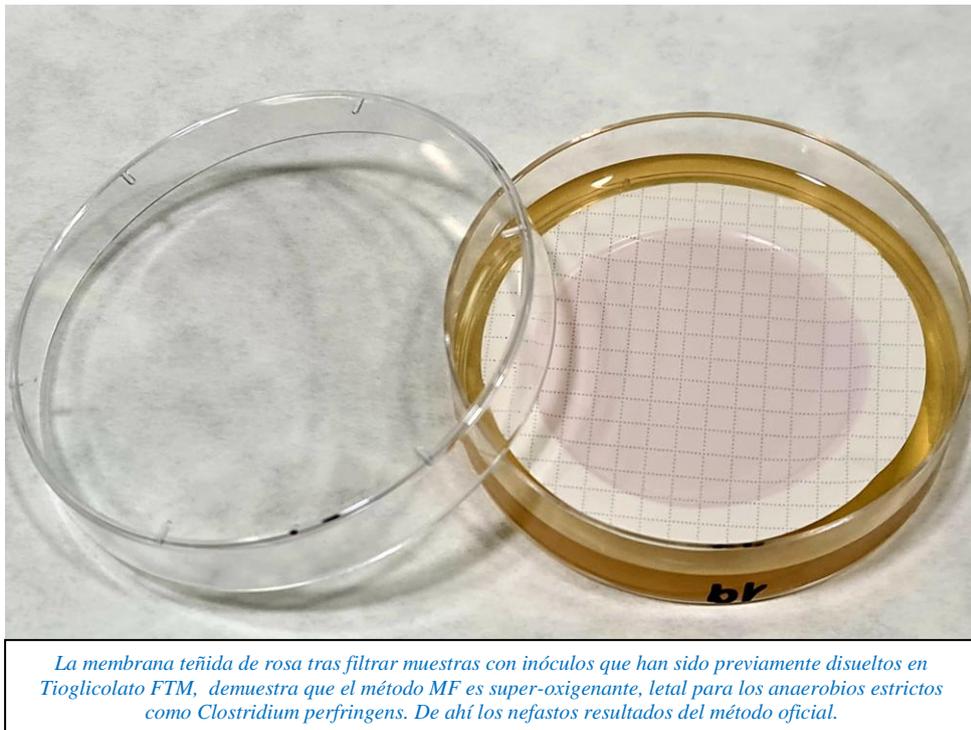
12-Personas que han realizado paso a paso la validación, acompañadas-guiadas por el asesor de MICROKIT, cargos, fechas y Firmas

1. Objetivos

El parámetro microbiológico más controvertido en aguas envasadas es el de clostridios, ya que dependiendo del tipo de agua, la legislación (Reales Decretos 140-2003, 314-2016 y 902-2018) ha ido pidiendo Clostridios sulfito-reductores o *Clostridium perfringens*, y esta dicotomía no tenía base científica alguna, ya que ambos parámetros sirven exactamente para lo mismo: si hay esporas de cualquiera de ellos, ha habido infiltración de aguas naturales no filtradas, por lo que puede haber en el agua final, enterovirus o incluso protozoos patógenos. Hubo una moratoria tras 2003 en aguas envasadas para que siguieran controlando sulfito-reductores en vez de perfringens, mientras en agua de consumo humano ya solo se miraba *C.perfringens*, pero reiteramos que carece de valor alguno distinguir entre ambos sub-parámetros, ya que no se busca *C.perfringens* como patógeno, sino sus esporas, como indicadoras de posible presencia de enterovirus y protozoos. En aguas de consumo humano está más claro el Real Decreto 902 de 2018 de 20 de Julio, que modifica el RD 140/2003, el RD 1798/2010 y el RD 1799/2010, y se habla ya solo del parámetro *Clostridium perfringens*. Olvidándonos entonces ya del

lento método de detección de Clostridios sulfito-reductores mediante el método de filtración en SPS Agar en 48 horas (que hemos seguido realizando hasta ahora, al igual que la mayoría de envasadoras de agua), el método estándar de recuento de *Clostridium perfringens* ISO 14189 por filtración en TSC Agar tiene el mismo grave problema añadido que el de clostridios sulfito-reductores: los resultados de todas las validaciones previas y de los ejercicios intercomparativos de las ultimas décadas demuestran que no son en absoluto fiables, arrojando más del 50% de falsos negativos y bajadas de carga de entre 1 y 2 log en recuento, con respecto al valor inóculo, es decir, si inoculamos 100 ufc en la muestra de agua, la filtración de membrana las reduce a 10 e incluso a 1 colonia. Esto es debido a que hablamos de microorganismos anaerobios estrictos, los únicos que dominaban la Tierra hace 3.500 millones de años, cuando el

cielo era rojo, la atmósfera anaerobia y no había plantas que creasen oxígeno. Tras la primera gran extinción masiva de nuestro planeta, debida a las



cianobacterias fotosintéticas y su imparable producción de oxígeno hasta el actual nivel del 21% de la atmósfera que respiramos, unos pocos representantes de esa microbiota original anaerobia lograron sobrevivir escondidos del aire en los lodos anaeróbicos y zonas anaerobias de los intestinos de los animales. Y subsistiendo fuera de esos hábitats en forma de esporas que sólo germinan en condiciones que aseguren la viabilidad de las formas vegetativas derivadas. Nadie parece haber tenido en cuenta la magnitud de la letalidad del oxígeno del aire en los clostridios, ya que los procedimientos oficiales se limitan a incubar en atmósfera anaerobia, sin tener en cuenta cómo el oxígeno está reduciendo cada segundo que pasa la viabilidad de cada ufc a lo largo de los pasos previos del análisis antes de la incubación.

Un segundo grave problema del método estándar es que las colonias negras típicas que reza la ISO 14189 con TSC Agar (o con SPS Agar), no suelen nunca ser negras tras la filtración, porque las pocas células que sobreviven a este método destructivo de anaerobios, están muy dañadas tras tanta oxigenación y no son capaces de reducir el sulfito a sulfuro de hierro (negro). Incluso si alguna colonia aparece negra, revierte a gris y luego blanca al sacar la placa de las condiciones de anaerobiosis para hacer el recuento.

Este grave error de método ya lo subsanó la ISO 9308-3 para *E.coli*, permitiendo el método NMP junto al de filtración de membrana, pero en un parámetro donde no era en absoluto necesario, ya que la filtración da resultados razonablemente buenos en *E.coli*-coliformes. Y el grave error del medio, cuyo color de las colonias revierte en presencia de aire, puede subsanarse, por ejemplo, empleando el medio cromogénico diseñado por MICROKIT para *Clostridium perfringens* (Cromokit CP Agar), donde las colonias diana, de color naranja, no cambian de color al sacar la placa de la bolsa de anaerobiosis. Este medio ha sido validado en otras industrias con resultados que demuestran que es el mejor para *C.perfringens*. Pero como hay que esperar la ausencia de todos los patógenos/indicadores para poder liberar los lotes, la permisividad oficial de métodos en solo un parámetro y su obcecación en emplear medios clásicos bioquímicos (porque aun son los que usa la mayoría de laboratorios) en vez proponer el uso de los modernos enzimáticos, con colonias cuyo color no revierte en presencia de aire, no ha resuelto el problema para los clostridios. 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* MugPlus Agar que en la ISO llaman CCA, 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, igual que ahora dejan fascinados el Cromokit CP Agar y el método que queremos validar, el QPA-TSC.

Un tercer problema actual en este parámetro de *C.perfringens* es la dicotomía entre los 100 mL de muestra que se toman para aguas de consumo humano y los 50 mL que se toman en aguas envasadas. Nosotros en el nuevo método tomaremos 100 mL (que de hecho es como hacer una réplica de los 50 mL que se nos exige legislativamente). Así, duplicaremos la probabilidad de encontrar *C.perfringens* cuando exista en la muestra. Y desde luego si hay más de 0 ufc/50 mL, también habrá más de 0 ufc/100 mL.

Nos proponemos demostrar en nuestras propias muestras e instalaciones, como sabemos ya han hecho otras embotelladoras y otras plantas de tratamiento de aguas potables, que el método directo SIN FILTRACION DE MEMBRANA en el mismo medio selectivo estándar de *Clostridium perfringens* (TSC Agar), y en 100 mL de muestra, funciona no equivalentemente, sino muchísimo mejor, que el método estándar oficial. 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 *Clostridium perfringens*, 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.

Otro tema a tener en cuenta es que las cepas de *Clostridium perfringens* que hay en el mercado son formas vegetativas, de modo que no existen esporas. Si añadimos los inóculos de formas vegetativas y realizamos después el shock térmico que hemos de realizar en las muestras naturales para detectar esporas, no podríamos nunca validar ningún método, ni siquiera podríamos demostrar si funciona el oficial, ya que en dicho shock térmico a 75-80°C, las esporas germinan pero las células vegetativas mueren. De modo que todos los inóculos serían negativos y estaríamos perdiendo el tiempo. Es por eso que en la validación omitimos el paso del shock térmico, lo cual no podríamos hacer en los posteriores análisis.

Y por último, también hay que tener en cuenta que la precisión demostrada será muy inferior a la real, dado que los inóculos de anaerobios estrictos no los podemos agitar-homogeneizar en vórtex, ni luego agitar las botellas de agua inoculadas para homogeneizar: nos limitaremos a voltear las cepas en los tubos de FTM y luego a voltear las botellas inoculadas con éstos, de modo que será más imposible que nunca conseguir réplicas de una misma botella de muestra con recuentos similares entre ellas.

2. Alcance

Las muestras de agua mineral envasada. 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 *Clostridium perfringens*. Es evidente la importancia de contrastar con métodos más fiables y más rápidos que el estándar, como es el uso directo del mismo medio TSC Agar, sembrado en masa en un formato que impida la entrada y renovación del oxígeno del aire, con la muestra de 100 mL de agua, 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 y espacio de almacén que eso supone.

4. Diseño del experimento

Realizaremos en un número de botellas de 30 muestras de 300 mL, obteniendo 4 análisis por muestra:

- 1- con el protocolo y medio de cultivo más habitual en aguas envasadas por filtración de membrana (placas SPS Agar 48h) en 50 mL de agua de muestra,
- 2- directamente con el mismo medio selectivo TSC Agar de la ISO 14189, pero en el método rápido o directo que proponemos y ya ha sido validado con excelencia en otras empresas: en formato QPA (bolsas herméticas con tapón a rosca que contienen el medio necesario para 100 mL de muestra; también contienen hidragar, el mismo gelificante en frío diseñado por Microkit para las placas herméticas que absorben 1 mL de muestra en otros parámetros como el recuento de aerobios: las DryPlates; y generador de anaerobiosis con testigo (enrojecimiento si hay exceso de aire) para eliminar el poco oxígeno que quede en la bolsa tras añadir los 100 mL de muestra de agua) en 100 mL de agua. El tiempo que toma realizar todo esto en cada muestra es de 1 minuto, similar al tiempo empleado en la letal filtración. Los resultados se leen incluso mejor al trasluz, ya que las colonias que crecen en profundidad podrían pasar desapercibidas si no damos la vuelta a la bolsa, y si el recuento es alto, es difícil saber qué colonias vemos por una cara y no vemos por la otra.
- 3- sus sendas réplicas idénticas (en vez de muestras duplicadas similares) para el estudio de la precisión

Por ello, 2x 50 mL y 2 x 100 mL suman exactamente una botella de 300 mL.

El que pretendemos validar, se trata de un método rápido (24 h en vez de 48 h) basado en la Norma ISO 14189, incluso con el medio normativo TSC Agar, pero optimizado con el formato explicado más arriba.

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 50/100 mL y tenemos dos métodos a comparar (el rápido y el estándar), si inoculamos las cepas en 300 mL de cada botella (30 botellas), podremos de la misma muestra hacer 4 réplicas: 2 del método estándar (50 mL/muestra) y 2 del método rápido (100 mL/muestra), de modo que a su vez estudiaremos en cada botella la precisión que conseguimos tras prolongada agitación (que puede ser tan enérgica como en los demás parámetros porque estaríamos oxigenando-destruyendo las dianas inoculadas), en la réplica de cada método. De modo que con 30 botellas de 300 mL obtendremos 60 placas y 60 QPAs.

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 muestras 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 células de *Clostridium perfringens* quedan destruidas 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 *Clostridium perfringens* 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 *Clostridium perfringens* 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 primer experimento se inicia el día 10 de Enero de 2022, los resultados se leen en 24h (el 11 de Enero) para el método rápido y el 12 de Enero para el método estándar.

Al leer los resultados, nos encontramos con el problema de que la cepa ha bajado 1 log desde su valor inóculo (sospechamos que por el tiempo transcurrido entre la inoculación-siembra y su introducción en la anaerobiosis, de unas 2-3 horas para hacer todas las muestras en serie, tiempo en que el oxígeno del aire ha destruido la mayoría de células del anaerobio estricto), con lo cual los resultados de la validación están todos en el rango muy bajo de recuento (encontramos entre 1 y 13 colonias por muestra cuando se buscaba entre 1 y 256). Aunque dados los resultados comparados entre el método estándar (no detecta ni una sola muestra positiva, ya que en las únicas 5 muestras positivas donde aparecen colonias, son colonias blancas y además son muestras con interferentes que son sin duda los que han crecido); y el rápido (detecta en sólo 24h, 13 de las 20 muestras positivas, como colonias negras típicas) podría considerarse suficiente al mejorar el método rápido al estándar, decidimos repetir la validación a la semana siguiente empleando la misma cepa (las otras dos cepas comerciales de *C.perfringens* tienen graves problemas) a concentraciones mayores; ahora que conocemos el nivel al que puede llegar su destrucción (1 log) preferimos seguir haciendo las muestras en serie, para no introducir nuevos factores de incertidumbre que podrían disparar toda la validación al rango muy alto.

Lógicamente los negativos son perfectamente válidos en el primer experimento y no hay ninguna necesidad de repetirlos, por lo que aprovecharemos el tiempo del segundo experimento realizando el doble de positivos (20 muestras en vez de 10), las mismas muestras para evaluar los límites de cuantificación de los métodos (10 muestras) y ninguna negativa.

Por otra parte, en el primer experimento queda muy claro que la temperatura de incubación de 37°C no es nada conveniente, al dar falsos positivos que no aparecen a 44°C, por lo cual en el segundo experimento se emplea sólo la temperatura de 44°C.

El segundo experimento se inicia el día 17 de Enero de 2022, los resultados se leen en 24h (el 18 de Enero) para el método rápido y el 19 de Enero para el método estándar.

El informe se redacta tras ambos experimentos, entre los días 13 y 21 de Enero de 2022.

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 y Micropipeta rango 10 - 100µL, Puntas para micropipetas
- Agitador Vórtex
- Autoclave
- Estufa a 37°C ± 1°C (sólo en el primer experimento) y Estufa a 44°C ± 1°C
- Nevera
- Asas de Digrasky de plástico estériles
- Asas de siembra plástico de 10 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 (se emplean 2 embudos por muestra)
- Soportes de filtración
- 2 Bombas de vacío
- Pinzas estériles
- Mechero bunsen, mecheros de alcohol

5.2 Medios y diluyentes a utilizar

Medios y diluyentes MICROKIT (excepto *)	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
Tubos 18 mL FTM para disolver la cepa diana anaerobia	Lote: 2201/3854 206 Cad: 03/01/2023
Placas 90 mm TSC para los negros	Lote: 2201/3854 206 Cad: 03/04/202
Ecoplaquis SPS Agar (* marca de máximo prestigio universal)	Lote: 19731 Cad: 23/09/2022
Bolsas herméticas QPA con TSC	Lote: 2111/3831 6 Cad: 05/11/2023
Generador de anaerobiosis Anaerokit y testigos Anaerotest	Lote: 2111/3834 6 Cad: 20/12/2025 Lote: HC154052 2 8 Cad: 30/11/2022
Generador de anaerobiosis y testigos BBL *	Lote: 0365697 Cad: 01/06/2022
M-Ident <i>Clostridium perfringens</i> (Lactosa, Gelatina, Nitratos y movilidad) para confirmación de colonias ISO 6461	Lote: 2111/3835 206 Cad: 15/11/2022
Nitratos A+B incluidos en el kit M-Ident <i>C.perfringens</i>	Lote: 18489-2 37 Cad:31/10/2022
Membranas Milipore * 47mm 0,22 µm ésteres de celulosa	Lote: 1MB15041 Cad: 9-2023

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.

(Fórmula por litro) pH final: 7,2 ± 0,2

FTM (Fluid Thioglicolate Anaerobic Medium):

Triptona	15,000 g
Glucosa	5,500 g
Extracto de levadura	5,000 g
Cloruro sódico	2,500 g
L-Cistina	0,500 g
Tioglicolato sódico	0,500 g
Resazurina	0,001 g
Agar-agar	0,750 g

(Fórmula por litro) pH final: 7,1 ± 0,2

TSC AGAR:

Peptona de caseína	15,00 g
Extracto de levadura	10,00 g
Citrato de Hierro	0,80 g
Sulfito sódico	0,50 g
Polimixina-B sulfato	0,01 g
Sulfadiacina sódica	0,12 g
Agar-agar	13,90 g

(Fórmula por litro) pH final: 7,0 ± 0,1

SPS AGAR:

Triptosa	15,00 g
Peptona papaínica de soja	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Citrato férrico amoniacal	1,0 g
Metabisulfito sódico	1,0 g
Agar-agar	18,0 g

(Fórmula por litro) pH final: 7.6 ± 0.2



Colonias diana en SPS Agar tras incubar 48 horas.
Abajo: Colonias diana en TSC en formato QPA



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>Clostridium perfringens</i> WDCM 00174	(1,58 ± 0,58) x 10E3 ufc/lenticula	23,13%	28-04-2022
<i>Enterobacter aerogenes</i> WDCM 00175	(2,12 ± 0,42) x 10E8 ufc/lenticula	13,80%	25-06-2022
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00087	(3,92 ± 0,70) x 10E4 ufc/lenticula	11,52%	07-10-2023
<i>Lactobacillus paracasei</i> Salvaje MKTS-MR	(2,62 ± 2,38) x 10E7 ufc/lenticula	53,84%	12-11-2022

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

Clostridium perfringens es la cepa diana, un Gram +, anaerobio estricto, que forma esporas resistentes al oxígeno que germinan a 75-80°C, es típico de aguas naturales que podrían estar contaminadas con enterovirus y protozoos (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Entamoeba*...) y por eso su presencia es un indicador de aguas peligrosas para la salud humana. Crece tras incubación en anaerobiosis en SPS Agar y en TSC Agar en 48h, con colonias negras, que pierden el color al oxigenarse. Puede confirmarse con las pruebas de la fosfatasa ácida de la ISO 14189, pero sus reactivos son cancerígenos. O bien con el fluorógeno MUP que también detecta la fosfatasa ácida, pero caduca en pocos días y es poco operativo. Mejor confirmar con los test de la anterior ISO 26461 (kit M-Iden *C.perfringens*): Lactosa (+, vira de rojo a amarillo), Gelatina (+, la licúa), Nitratos (+, vira a rosa) y Movilidad (-, no hay crecimiento alejado del inóculo en picadura). No elegimos otra cepa diana adicional ya que se habla de *Clostridium perfringens* y por tanto, no necesitamos dos cepas diana como sucede en el caso de “*Enterococos fecales*” o de “*Salmonella spp*”, por ejemplo.

Enterobacter aerogenes es un Gram – típico del agua contaminada por aguas fecales, anaerobio facultativo interferente porque a menudo aparece en SPS y TSC en sólo 18-24h con colonias similares a las de *Clostridium perfringens* (grises o negras). El kit M-Iden *C.perfringens* da reacciones diferentes a la de *Clostridium perfringens*.

Enterococcus faecalis es otro anaerobio facultativo interferente, un coco Gram + típico del agua contaminada con aguas fecales, capaz de crecer en en SPS y TSC en sólo 18-24h con colonias similares a las de *Clostridium perfringens* (grises o negras). El kit M-Iden *C.perfringens* da reacciones diferentes a la de *Clostridium perfringens*.

Lactobacillus paracasei es otro anaerobio facultativo interferente, un bacilo Gram + típico de alimentos lácteos y de contaminación del agua por baño de mamíferos, capaz de crecer en en SPS y TSC en sólo 18-24h con colonias similares a las de *Clostridium perfringens* (grises o negras). Es una cepa salvaje, con gran fuerza como interferente. El kit M-Iden *C.perfringens* da reacciones diferentes a la de *Clostridium perfringens*.

No hemos elegido el otro Clostridio típicamente sulfito-reductor *Clostridium sporogenes* porque en anteriores validaciones no resulta ser interferente de *Cl.perfringens* a 44°C en absoluto.

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 300 mL de agua envasada procedente del lote recién fabricado el mismo día de la validación. 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. Y la diana en tubos repletos (18 mL) de FTM, el caldo anaeróbico por excelencia, con muy poco aire en cada tubo para evitar su oxigenación. Con meticulosidad para no perder ninguna de las lentículas que conforman las mismas, atemperadas para que se disuelvan, y agitando después, con un vórtex para conseguir una correcta homogeneización. Evitando espumar/oxigenar en el caso de la diana. Realizamos las diluciones decimales pertinentes de las interferentes en tubos de 9 mL de solución salina marina al 0,9%. De la diana no hace falta hacer diluciones, dado que la lentícula está a nivel $10E3$
- Realizamos los negros de inóculo directo en placas de 90 mm de TSC y en las Ecoplaquis de 55 mm de SPS, para cada cepa, y por duplicado, repartiendo con asa Digralsky en cada uno de los dos medios. 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 300 mL (4 submuestras: 2 de 50 mL para MF y 2 de 100 mL para QPA) para conseguir la cantidad aproximada de colonias que queremos en cada placa. Dado que en el método oficial empleamos 50 mL de agua en vez de los 100 mL que empleamos en el método rápido, luego hemos de dividir por 2 los resultados de 100 mL o multiplicar por 2 los resultados de 50 mL, da igual, para que la comparativa sea real. Una vez determinado el valor inóculo, trasparamos 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's originales en células aisladas y que cada colonia proceda, lo más posible, de una sola célula. Pero en este caso hemos de limitarnos a voltear sin que el aire de la botella forme burbujas que oxigenen el agua y destruyan las células de la diana.

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

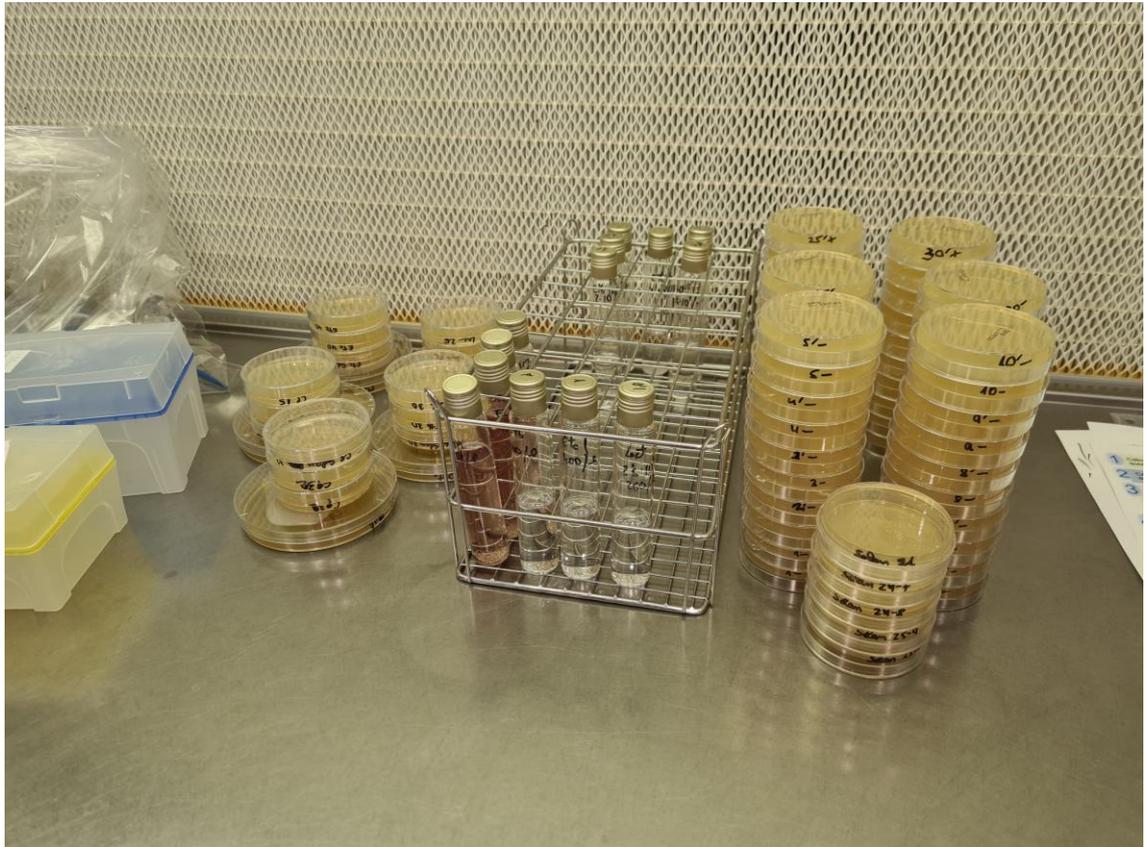
Clostridium perfringens ($1,58 \pm 0,58$) $\times 10^3$ ufc/lentícula, en el primer experimento, en el tubo 1 con 18 mL de FTM añadimos 3 lentículas, por lo que hay $1.580 \times 3 / 18 = 263$ ufc/ml. Al añadir 3 mL a los 300 mL de agua, deberían aparecer 263 colonias/100 mL (= 131 colonias/50 mL) pero la realidad es que aparecen entre 1 y 3 colonias diana en QPA-100 mL y ninguna por filtración-50 mL. Necesitamos 4 tubos 18 mL FTM para los positivos y otros tantos para los límites de cuantificación. Por eso en el segundo experimento, sin variar ninguna otra componente de la incertidumbre, es decir, emulando el experimento idéntico al primero, añadimos 10 veces más lentículas por tubo FTM de 18 mL, es decir, 30 por tubo. Así, si en el primer experimento con 3 lentículas/tubo FTM salieron 1-3 colonias/100 mL, ahora deberían salir 10-30 colonias/100 mL (5-15 colonias/50 mL). Tenemos 150 lentículas disponibles, por lo que a 30 por tubo, conseguiremos 5 tubos FTM 18 mL que en teoría deberían darnos muestras con niveles de diana más elevados. Por ejemplo, añadiendo 3 mL a una botella de 300 mL deberían aparecer entre 10 y 30 colonias por 100 mL de muestra en QPA (entre 5 y 15 colonias por 50 mL de muestra en Filtración de Membrana). Por otra parte, en la segunda forma de realizar el experimento 2 (en la que metemos en atmósfera de anaerobiosis las placas inmediatamente después de filtrar cada par), volvemos a realizar los cálculos como hicimos en el experimento 1, es decir, con los valores inóculo certificados por el proveedor de las cepas.

En cuanto a los negativos, en el segundo experimento no hay necesidad de repetirlos, ya que en el primero salieron bien y no tiene sentido alguno perder el tiempo repitiéndolos:

Enterobacter aerogenes ($2,12 \pm 0,42$) $\times 10^8$ ufc/lentícula, en tubo 1 hay $2,12 \times 10^7$ /ml, en tubo2 (dil 1:100 del tubo1) hay $2,12 \times 10^5$ /ml, en tubo3 (dil 1:100 del tubo2) hay $2,12 \times 10^3$ /ml y en tubo 4 (dil 1:10 del tubo3) hay 21 ufc/0,1 ml, por lo que al añadirse 0,3 ml a 300 mL de agua, habría $21 \text{ ufc}/100 \text{ mL} = 21 \text{ col/placa}$

Enterococcus faecalis ($3,92 \pm 0,70$) $\times 10^4$ ufc/lentícula, en tubo1 hay 4×10^3 /ml, en tubo 2 (dil 1:10 del tubo1) hay 40 ufc/0,1 ml, que al añadirse 0,3 mL a 300 mL de agua, contendría $40 \text{ ufc}/100 \text{ mL} = 40 \text{ col/placa}$

Lactobacillus paracasei ($2,62 \pm 2,38$) x 10^7 ufc/lenticula, en tubo 1 hay $2,62 \times 10^6$ /ml, en tubo2 (dil 1:100 del tubo1) hay $2,62 \times 10^4$ /ml, en tubo3 (dil 1:100 del tubo2) hay 26 ufc/0,1 ml, y al añadirse 0,3 ml a 300 mL de agua, contendría 26 ufc/100 mL = 26 col/placa



Preparación de los inóculos, de los negros y marcado de parte 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 μ l necesarios de cada tubo para obtener el número deseado de colonias por placa, siempre a partir de un mínimo de 4 colonias/placa y un óptimo de al menos 8 colonias/placa. Los valores elegidos están plasmados en las tablas de resultados.

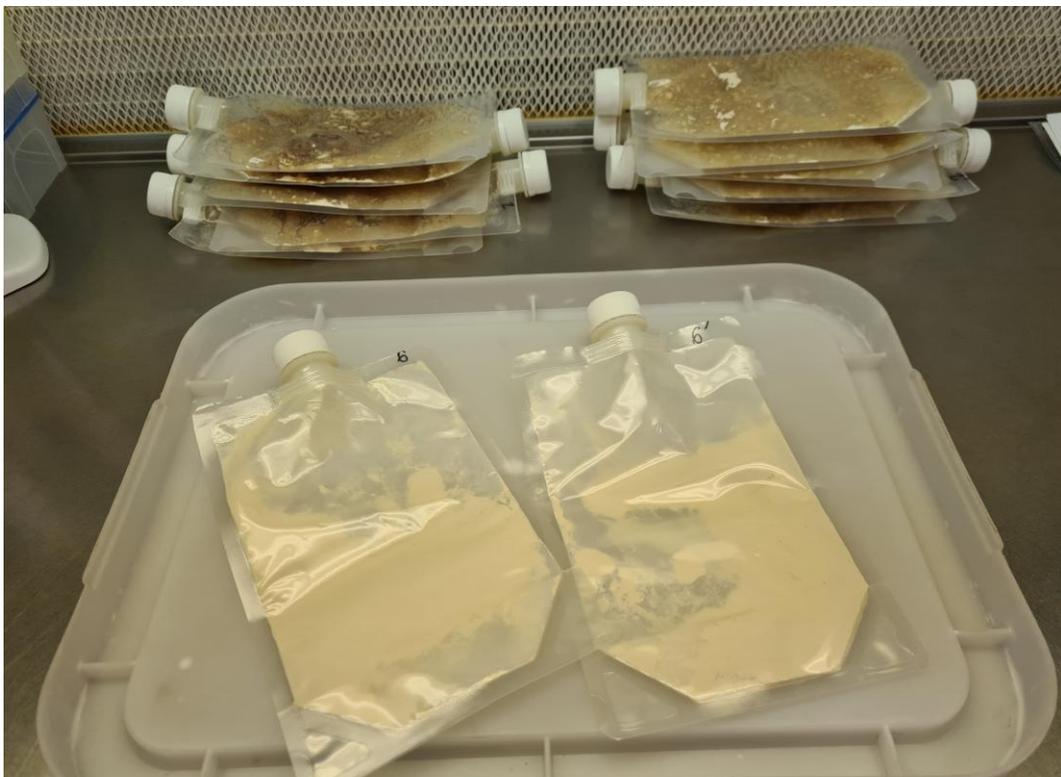
- Controles negativos para verificar que los medios empleados están estériles: A una de las muestras (la 1 en el experimento 1 y la 22 en el experimento 2) no le añadimos



Filtración de dos réplicas por rampa, dos muestras cada vez

ningún tipo de inóculo y será considerada como “muestra vacía” o blanco.

- Filtramos 50 mL de muestra por ensayo. La filtración se realiza con embudos de filtración estériles y filtros de membrana estériles de 0,22 μm . Se pone especial cuidado en esterilizar flameando con alcohol la base de cada embudo antes y después de cada filtración. Una vez filtrados los 50 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 de SPS Agar. Dado que sabemos que los laboratorios oficiales ponen la membrana al revés (cara filtrada contra el medio) para los parámetros anaerobios, hacemos cada muestra con la membrana boca arriba y su réplica con la membrana boca abajo, a ver si la diferencia obtenida justifica este cambio.
- Una vez filtradas todas las muestras, se introducen en bolsas de anaerobiosis con doble generador y doble testigo (dos marcas comerciales) antes de incubar. En el primer experimento, a falta de clips de cierre de las bolsas, se meten 15-20 placas por bolsa. Y todas ellas se meten en anaerobiosis al final. En el segundo experimento se llevan más clips para que pueda haber 4 placas/bolsa y por tanto la atmósfera de anaerobiosis sea más intensa por placa. Y en parte de este segundo experimento se emula el primero dejando todas las placas filtradas juntas para meter en anaerobiosis al final; mientras en otra parte del experimento, se van metiendo en anaerobiosis cada dos placas de las réplicas inmediatamente después de filtrar.



Sistema QPA:

Abajo bolsas sin inocular, Arriba, bolsas inoculadas y homogeneizadas-planchadas

- Antes de meter las placas en la estufa de incubación, se realizan las réplicas de muestras en el sistema QPA
- Se añaden 100 mL de agua de muestra por bolsa QPA cuidando que no rebosen al llenarlas y que quede la mínima cantidad posible de aire en el interior antes de cerrar el tapón a rosca. Se amasan y planchan para mezclar lo mejor posible el medio con la muestra de agua. Los grumos desaparecerán durante la incubación, de modo que se tarda 1 minuto por muestra en este moderno sistema.



Sistema QPA:

Proceso de homogeneización de la muestra de agua con el medio en polvo y planchado antes de su incubación

- Todas las placas (incluidas las de los “negros”) y los QPA se incuban juntos para disminuir la imprecisión. En el primer experimento, la mitad de las muestras se incubaba a 37°C como se viene haciendo de rutina en el laboratorio. La otra mitad a 44°C como marcan los métodos oficiales y las etiquetas de los productos MICROKIT.



Incubación simultánea a 44°C de las placas de SPS en bolsas de anaerobiosis y de las bolsas QPA de TSC, todas juntas

En el segundo experimento, una vez demostrada claramente la idoneidad de incubar a 44°C y no a 37°C, todo se incubó a 44°C.

- Transcurrido el tiempo de incubación se hace el recuento de las colonias sospechosas en cada una de las placas de cultivo y bolsas QPA. El recuento en placas SPS a las 48 h es nulo en el primer experimento: todas las placas con colonias blancas resultan ser de muestras con interferentes. Ni una sola placa ofrece colonias negras diana. Lo cual es muy típico, como sabe cualquier laboratorio que participe en intercomparaciones, lo que demuestra que el método oficial no funciona en absoluto. Las bolsas QPA de TSC en sólo 24h sí que muestran colonias negras en las muestras positivas.

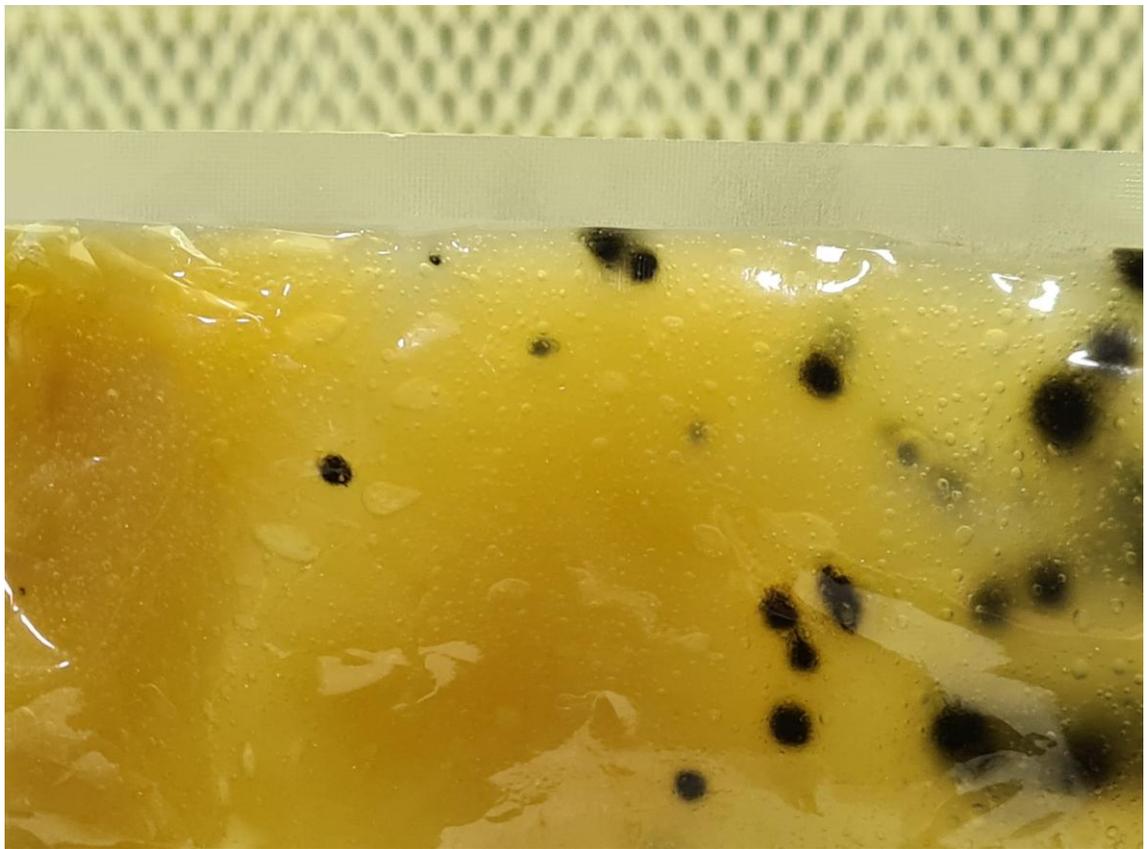


Frustrantes resultados del método oficial en 48 horas: ni una sola colonia negra en todo el experimento. Además, las colonias blancas pertenecen a interferentes



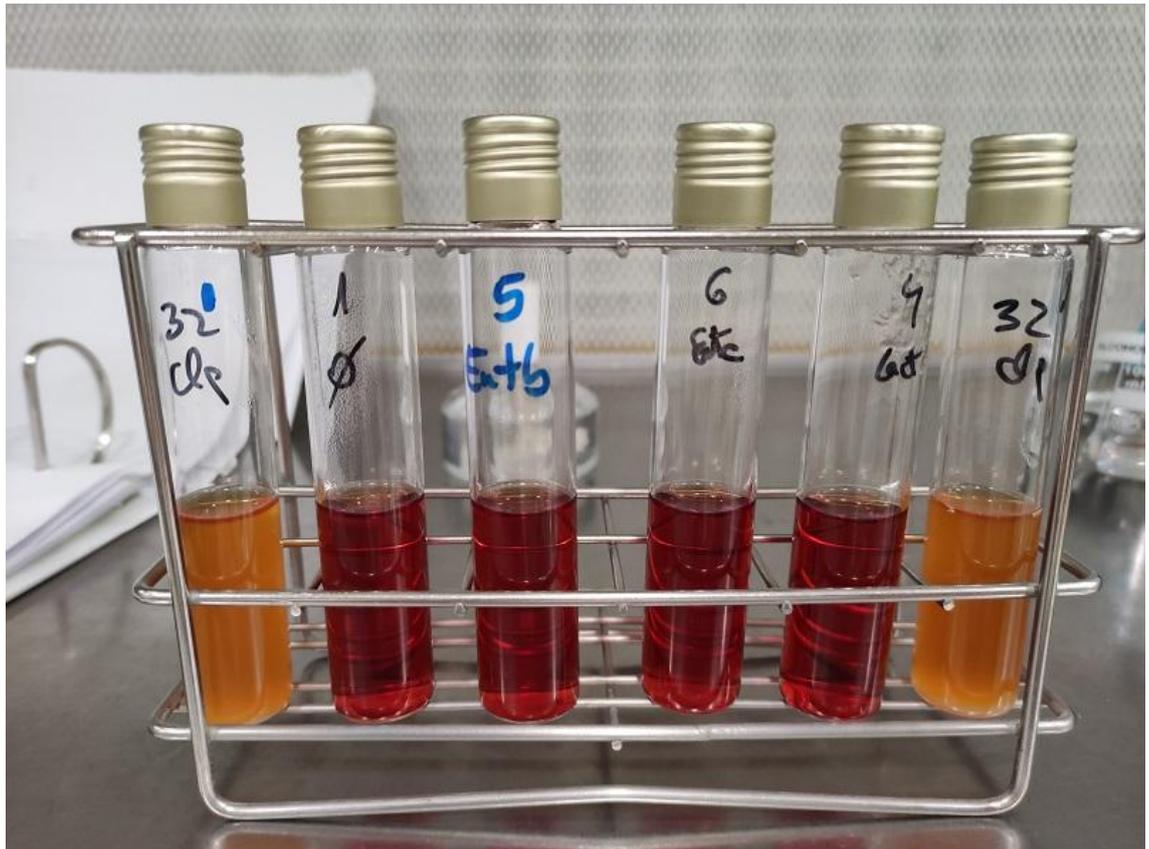
Resultados QPA en sólo 24 horas: Izda 1 colonia negra; Dcha: 8 colonias negras. Al trasluz se ven todavía mejor

- 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.
- Falsos positivos: en el método de Filtración en placa de SPS, todos los interferentes han dado falso positivo, con colonias blancas que, dado que sabemos que en placa difícilmente la diana aparece con colonias negras, serían tomadas como falsos positivos que nos harían perder tiempo confirmando colonias que finalmente veríamos que no eran de la diana. En el método QPA, sólo ha habido falsos positivos en 3 de las 20 muestras incubadas a 37°C y en ninguna incubada a 44°C. Además se trata de colonias muy diferentes a las de la diana: en vez de negras y nítidas (a menudo con burbuja de gas), los interferentes forman halos grises, sin el centro negro.



Colonias típicas de Clostridium perfringens en 24h en QPA-TSC: negras, idénticas a las que salen en el Agar TSC clásico cuando se añade una segunda capa de medio TSC sobre la membrana filtrada. Las colonias del fondo se ven mejor al trasluz.

- Se realiza la confirmación M-Ident *C.perfringens* tanto en las colonias negras de las diana como en las grises de interferentes (que sólo han crecido a 37°C, ninguno a 44°C): tubos de Lactosa-Gelatina y tubos de Nitratos-Movilidad.

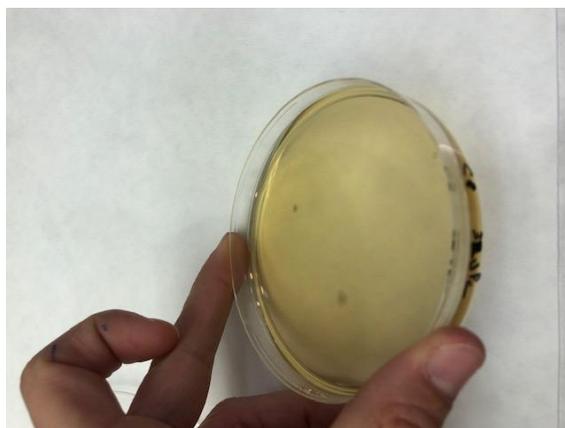


Sólo las colonias diana de C.perfringens provocan viraje del medio M-Ident lactosa-gelatina, de rojo a naranja. Ninguno de los 3 interferentes lo hace (Enterobacter, Enterococcus y Lactobacillus). Además, C.perfringens licúa la gelatina (al tumbar el tubo, ve que el medio ha dejado de ser sólido y es líquido)

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 (SPS Agar y TSC 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% (la diana en tubos llenos de FTM 18 mL). Sembramos en superficie la cepa diana con ayuda de asas de Digrasky estériles en los dos medios de cultivo utilizados en esta validación. Se emplean para estos negros, placas de 90 mm (en el caso del TSC Agar) para evitar que, como en anteriores validaciones, el asa Digralsky no reparta homogéneamente (lo cual sucede a menudo en plaquitas de filtración de 50-60 mm). El volumen de cepa inoculada en las placas se calcula para encontrar un número razonable (dentro del rango medio-bajo de recuento) de colonias en las placas. El inóculo se realiza con micropipeta y puntas estériles. En las cepas interferentes no hace falta recuento, pero se siembra igual con asa Digralsky para poder observar el recuento y además cómo son las colonias de cada una de ellas en cada uno de los dos medios comparados en esta validación: blancas e indistinguibles entre sí.

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.



Negros en placa TSC 90 mm: De 32 ufc inoculadas directamente, sólo aparecen 2 colonias y para más frustración, no son negras. El tiempo de espera entre la inoculación y la introducción en bolsas de anaerobiosis hace estragos en la diana. Negros en placa SPS 55 mm: Todavía peor, ni una sola colonia, ni siquiera colonias blancas

Una vez incubadas las placas de los negros se realiza el conteo 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 en el experimento 1 y en la muestra 22 en el experimento 2.

Los negros previos al experimento de validación demuestran que la cepa baja su concentración al 25-50% sobre el valor certificado, y casi todas las colonias son blancas. Los negros obtenidos el día del primer experimento de la validación en placa de 90 mm de TSN y en placa de 55 mm de SPS son:

Cepa y concentración teórica ufc/placa	Valor teórico según CCC de la cepa	Nº colonias obtenidas TSC 90 mm	Nº colonias obtenidas SPS 55 mm
Diana <i>Clostridium perfringens</i>	32 ufc	2	0, 0, 0*
	15 ufc	0	0, 0, 0*
<i>Enterobacter aerogenes</i>	30	44	1, 0, 0*
<i>Enterococcus faecalis</i>	40	3, 6	4, 3, 1*
<i>Lactobacillus paracasei</i>	26	61	51, 56, 18*

: Las placas de SPS preparadas por Microkit tienen 14 mL de medio. Las preparadas previamente por el laboratorio () tenían sólo 8 mL de medio, lo cual empeora los resultados de los negros.

Se observa una importante bajada de la concentración de las diana incluso en los negros (al menos 2 log respecto al valor inoculado). En todo protocolo de búsqueda de *Clostridium perfringens* debería constar la extrema importancia de apresurarse en guardar en anaerobiosis las placas inmediatamente después de que las muestras sean filtradas. Estos resultados de los negros invalidan los resultados positivos de este primer experimento y nos obligan a hacer un segundo experimento una semana después, teniendo en cuenta estas conclusiones.

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.

En el segundo experimento de esta validación, los negros también se duplican con 2 métodos: a) el del primer experimento, metiéndolos en anaerobiosis sin prisas, al final del trabajo con todas las muestras; y b) metiéndolos en anaerobiosis inmediatamente después de su inoculación en las placas:

	Valor teórico	Valor obtenido
Negro 1 (anaerobiosis al final del experimento)	3 ufc	0
Negro 2 (anaerobiosis al final del experimento)	7 ufc	0
Negro 3 (anaerobiosis inmediata)	5 ufc	0
Negro 4 (anaerobiosis inmediata)	10 ufc	0
Negro 5 (anaerobiosis inmediata)	20 ufc	0

El hecho de que no sólo las muestras de filtración de membrana, sino también los negros (aunque eran todos de rango bajo), den recuentos 0, demuestra hasta qué punto es letal la oxigenación en cepas de anaerobios estrictos. Y que sí sean capaces de crecer en métodos alternativos como el QPA, demuestra que estaban subletales, pero no destruidos,

Otra conclusión de anteriores validaciones 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. Si se emplean medios de calidad inferior y en placa de 60 mm, se obtendrá una reducción hasta incluso 1/5 del valor inóculo, por lo que

los cálculos de los inóculos finales se harían hasta 5 veces por encima de la realidad, de modo que se desplazarían todos los resultados hacia el rango alto y no se obtendrían recuentos en los rangos bajos.

No se aplicarán factores de corrección a raíz de los resultados a la baja de los negros, porque los inóculos en ambos medios son teóricamente idénticos, y aunque la incertidumbre microbiológica suele jugar una mala pasada en algunas muestras, los árboles deben dejarnos ver el bosque: lo importante es comparar los resultados del método rápido con respecto al método 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 QPA recupere como mínimo el 50% del valor conseguido por el método de filtración de membrana; como ideal el 70%; y como excelente el 90% o más, como ha sido el caso, al superar el 100%. De hecho el método QPA invalida en este primer experimento al método de filtración, ya que ha sido capaz de encontrar 40 colonias negras cuando el estándar no ha encontrado ni una sola colonia sospechosa (negra), ni siquiera ni una sola colonia blanca que no fuera procedente de interferentes. En el segundo experimento, se repite la situación, pero de forma más dramática, ya que el QPA detecta en el 100% de muestras positivas y en los tres rangos de recuento, mientras la filtración de membrana no detecta ni siquiera en el rango alto, donde el QPA ha sido capaz de hacer crecer hasta 243 colonias en 100 mL de muestra.

7. Resultados

En el primer experimento, se observa una enorme diferencia entre los 2 métodos comparados: el estándar no detecta ni una sola colonia sospechosa (negra) ni siquiera en 48 horas, mientras el método rápido, en sólo 24 h, detecta 40 colonias negras (en 13 muestras de 20 positivas: 65% de sensibilidad, frente al 0% de sensibilidad del método oficial). Sólo con eso ya se demuestra mejor método el QPA, pero repetimos en un segundo experimento una semana después para obtener recuentos más altos por muestra, mejorar esa sensibilidad del método rápido a niveles aceptables (>95%) y poder aplicar la estadística propia de un método cuantitativo.

En el segundo experimento, se repite la situación en cuanto al abismo de resultados entre el método oficial de filtración (0 positivos en todo el experimento, 100% de falsos negativos, ni una sola colonia, ni negra, ni siquiera no negra); y el método alternativo QPA (todos positivos, 100% de sensibilidad al haber 0% de falsos negativos, con cientos de colonias negras) y además se consiguen recuentos en QPA no sólo en el rango bajo como en el primer experimento, sino también en el medio y en el alto.

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.

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO:*Clostridium perfringens*Agua mineral envasada..... **NEGATIVOS**

TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 24h y 48h a 37°C o a 44°C FECHA: 10-11/1/2022 **EXPERIMENTO 1**

BOTELLA	MATRICES Y CEPAS EN 3 RANGOS			INÓCULOS Y RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS			
	VALOR EJEMPLO	MOTIVO	VALOR REAL	Cálculos/botella	Inóculo/placa	QPA-TSC 24h	Ecoplaquis SPS 48 h
1	1: 0 diana+0 interf+0 acomp	Blanco	+ +	0	0	2 burbujas grises	0
	2: Es 1 repe 44°C		+ +	0	0	0	0
2	3: 0 diana+20 interferente1	Falsos positivos (exclusividad)	+	0,1 ml t4 = 20 ufc Etb	0	0	0
	4: Es 3 repe 44°C		+	“ ” ”	0	0	0
3	5: 0 diana+20 interferente 2		+	0,05 ml t2 = 20 ufc Etc	0	0	0
	6: Es 5 repe 44°C		+	“ ” ”	0	0	1 blanca
4	7: 0 diana+13 interferente 3		+	0,05 ml t3 = 13 ufc Lact	0	1 burbuja gris	3 blancas
	8: Es 7 repe 44°C		+	“ ” ”	0	0	0
5	9: 0 diana+40 interferente1		+	0,2 ml t4 = 40 ufc Etb	0	3 burbujas grises	0
	10: Es 9 repe 44°C		+	“ ” ”	0	0	0
6	11: 0 diana+40 interferente2		+	0,1 ml t2 = 40 ufc Etc	0	3 burbujas grises	1 blanca
	12: Es 11 repe 44°C		+	“ ” ”	0	0	5 blancas
7	13: 0 diana+39 interferente3	+	0,15ml t3 = 39 ufc Lact	0	0	0	
	14: Es 13 repe 44°C	+	“ ” ”	0	0	0	
8	15: 0 diana+80 interferente1	+	0,4 ml t4 = 80 ufc Etb	0	0	0	
	16: Es 15 repe 44°C	+	“ ” ”	0	0	0	
9	17: 0 diana+80 interferente2	+	0,2 ml t2 = 80 ufc Etc	0	0	2 blancas	
	18: Es 17 repe 44°C	+	“ ” ”	0	0	0	
10	19: 0 diana+78 interferente3	+	0,3 ml t3 = 78 ufc Lact	0	0	25 blancas	
	20: Es 19 repe 44°C	+	“ ” ”	0	0	0	

Interferentes: 1-*Enterobacter aerogenes* (2,12 ± 0,42) x 10⁸ ufc/lent 2-*Enterococcus faecalis* (3,92 ± 0,70) 10⁴ ufc/lent 3-*Lactobacillus paracasei* (2,62 ± 2,38) x 10⁷ ufc/lent

Notas e incidencias: Con *Cl.perfringens* emplearemos en su disolución tubos repletos FTM en vez de Salina, al ser anaerobio; con las demás, salina marina al 0,9%.

Las botellas han de quedar con 300 mL, no con 1 L, al mirarse en 100 mL en los 2 QPA y en 50 mL por filtración

Probar en cada réplica: una membrana hacia arriba y otra hacia abajo (sólo en los positivos) a ver si mejoran los resultados las membranas hacia abajo

A qué temperatura incuban? Pretendemos ver si podemos desmitificar la necesidad de incubar este parámetro a 44°C, haremos duplicados en positivos y en límites:

Efectivamente, mucho mejor a 44°C, sin falsos positivos y con más altos recuentos. Usar Anaerokit con Anaerotest para atmósfera de anaerobiosis en placas y luego confirmar colonias con M-Ident

Todos los falsos positivos en QPA son a 37°C, ninguno a 44°C. 4 muestras con falso + en QPA a 37°C, idem en Filtración; 0 muestras con falso + en QPA a 44°C (100% especificidad), 2 muestras con falso + en Filtración a 44°C (80% especificidad)

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO: *Clostridium perfringens* Agua mineral envasada **LIMITES DE CUANTIFICACIÓN**
 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 24h y 48h a 37°C o a 44°C FECHA: 10-11/1/2022 **EXPERIMENTO 1**

BOTELLA	MATRICES Y CEPAS EN 3 RANGOS		INÓCULOS Y RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS			
	VALOR IDEAL:	MOTIVO:	Cálculos/botella	Inóculo/placa	QPA-TSC 24h	Ecoplaquis SPS 48 h
11	1: 4 ufc diana a 37°C	Límites cuantificación	0,1mL t1 = 16 ufc	4 ufc/100 mL	1 enana	0
	2: Es 1 repe		“ ” ”	“	0	0
12	3: 4 ufc diana a 44°C		“ ” ”	“	0	0
	4: Es 3 repe		“ ” ”	“	0	0
13	5: 8 ufc diana a 37°C		0,2mL t1 = 32 ufc	8 ufc/100 mL	0	0
	6: Es 5 repe		“ ” ”	“	0	0
14	7: 8 ufc diana a 44°C		“ ” ”	“	0	0
	8: Es 7 repe		“ ” ”	“	0	0
15	9: 12 ufc diana a 37°C		0,3mL t1 = 48 ufc	12 ufc/100 mL	0	0
	10: Es 9 repe		“ ” ”	“	0	0
16	11: 12 ufc diana a 44°C		“ ” ”	“	0	0
	12: Es 11 repe		“ ” ”	“	0	0
17	13: 48 ufc diana a 37°C		1,2mL t1 = 192 ufc	48 ufc/100 mL	0	1 blanca + 0 negras
	14: Es 13 repe		“ ” ”	“	1	0
18	15: 48 ufc diana a 44°C		“ ” ”	“	1	0
	16: Es 15 repe		“ ” ”	“	0	0
19	17: 64 ufc diana a 37°C		1,6mL t1 = 256 ufc	64 ufc/100 mL	1	0
	18: Es 17 repe		“ ” ”	“	0	0
20	19: 64 ufc diana a 44°C		“ ” ”	“	1	0
	20: Es 19 repe		“ ” ”	“	0	0

Diana: *Clostridium perfringens* (1,58 ± 0,58) x 10³ ufc/lent

Notas e incidencias: Al estar esta cepa a tan baja concentración, necesitaremos varias lenticulas, no sólo 1 como en Enterococos o en Pseudomonas
 6,4 ml+4,8 ml+1,2ml+0,8ml+0,4ml = 13,6 mL del t1, equivale a casi 2 lenticulas diana (544 ufc)

4 positivos en QPA (los inóculos altos), 0 positivos en filtración

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO: *Clostridium perfringens* Agua mineral envasada **POSITIVOS**

TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 24h y 48h a 37°C o a 44°C FECHA: 10-11/1/2022 **EXPERIMENTO 1**

BOTELLA	MATRICES Y CEPAS EN 3 RANGOS		INÓCULOS Y RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS			
	VALOR IDEAL:	MOTIVO:	Cálculos/botella	Inóculo/placa	QPA-TSC 24h	Ecoplaquis SPS 48 h
21	1: 16 diana a 37°C	0,4mL t1 = 64 ufc " " "	16 ufc/100 mL	10 ufc	0	0
	2: Es 1 repe membrana abajo		"	"	1	0
22	3: 16 diana a 44°C	" " "	"	15 ufc	0	0
	4: Es 3 repe membrana abajo		"	"	0	0
23	5: 16 diana + 20 interf 1 a 37°C	" + 0,1 ml t4 (20 Etb) " " "	"	10 ufc Ps.aer 5 ufc B.cep 6 ufc Etc.fae 6 ufc M.lut	0	0
	6: Es 5 repe a 44°C		Rango Bajo	"	"	1
24	7: 32 diana a 37°C	0,8mL t1 = 128 ufc " " "	32 ufc/100 mL	36 ufc	3	0
	8: Es 7 repe membrana abajo		"	"	0	0
25	9: 32 diana a 44°C	" " "	"	24 ufc 20 ufc B.cep	1	0
	10: Es 9 repe membrana abajo		" + 0,1 ml t2 (40 Etc) " " "	"	"	2
26	11: 32 diana + interf.2 a 37°C	" + 0,15ml t3 (39 Lact) " " "	"	24 ufc 48 ufc Etc.fae	2	1 blanca
	12: Es 11 repe a 44°C		"	"	1	1 blanca
27	13: 32 diana + interf.3 a 37°C	Rango medio	"	24 ufc 36 ufc M.lut	1	23 blancas
	14: Es 13 repe a 44°C		"	"	0	1 blanca
28	15: 64 diana a 37°C	1,6mL t1 = 256 ufc " " "	64 ufc/100 mL	72 ufc	2	0
	16: Es 15 repe membrana abajo		"	"	1	0
29	17: 64 diana a 44°C	" " "	"	98 ufc	1	0
	18: Es 17 repe membrana abajo		"	"	1	0
30	19: 64 diana + 40 interf 1 + 40 interf 2 + 39 interf 3 a 37°C	" + 0,2 ml t4 (40 Etb) + 0,1 ml t2 (40 Etc) + 0,15ml t3 (39 Lact) Rango alto	"	72 ufc Ps.aer 40 ufc B.cep 48 ufc Etc.fae 48 ufc M.lut	0	0
	20: Es 19 repe a 44°C		" " "	"	"	1

Diana: *Clostridium perfringens* (1,58 ± 0,58) x 10³ ufc/lent Interferentes: 1-*Enterobacter aerogenes* (2,12 ± 0,42) x 10⁸ ufc/lent 2-*Enterococcus faecalis* (3,92 ± 1,38) 10⁴ ufc/lent 3-*Lactobacillus paracasei* (2,62 ± 2,38) x 10⁷ ufc/lent Notas e incidencias: Al estar esta cepa a tan baja concentración, necesitaremos varias lenticulas, no sólo 1 como en Enterococos o en Pseudomonas 6x1,6ml + 8x0,8ml + 6x0,4ml = 9,6+6,4+2,4 mL del t1 = 18,4, equivale a otras 3 lenticulas diana (384+256+96 = 736 ufc): 7 falsos negativos de 20 en QPA (65% de sensibilidad, al reducirse los inóculos respecto a los calculados) y 20 falsos negativos de 20 en filtración (0% de sensibilidad)

TRAS REPETIR TODO EL EXPERIMENTO UNA SEMANA DESPUÉS, TENIENDO EN CUENTA TODO LO APRENDIDO EN EL EXPERIMENTO 1, LOS RESULTADOS DEL EXPERIMENTO 2 PERMITEN OBTENER DATOS MÁS SIGNIFICATIVOS, CON RECuentOS MÁS ALTOS:

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO: *Clostridium perfringens* Agua mineral envasada ... **LIMITES DE CUANTIFICACIÓN**
 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 24h y 48h a 44°C FECHA: 17-18/1/2022 **EXPERIMENTO 2 SIN ANAEROBIOSIS INMEDIATA****

BOTELLA	MATRICES Y CEPAS EN 3 RANGOS		INÓCULOS Y RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS			
	VALOR IDEAL:	MOTIVO:	Cálculos/botella	Inóculo/placa	QPA-TSC 24h	Ecoplaquis SPS 48 h
11	1: 1-2* ufc diana	Límites cuantificación	1 lent = 562 µL	1-2 ufc	16	0
	2: Es 1 repe		1 lent = 562 µL	1-2 ufc	15	0
12	3: 1-2 ufc diana		1 lent = 562 µL	1-2 ufc	8	0
	4: Es 3 repe		1 lent = 562 µL	1-2 ufc	21	0
13	5: 3-6 ufc diana		2 lent = 1124 µL	2-4 ufc	28	0
	6: Es 5 repe		2 lent = 1124 µL	2-4 ufc	53	0
14	7: 3-6 ufc diana		2 lent = 1124 µL	2-4 ufc	29	0
	8: Es 7 repe		2 lent = 1124 µL	2-4 ufc	40	0
15	9: 4-8 ufc diana		3-4 lent = 1686 µL	4-8 ufc	29	0
	10: Es 9 repe		3-4 lent = 1686 µL	4-8 ufc	54	0
16	11: 4-8 ufc diana		3-4 lent = 1686 µL	4-8 ufc	43	0
	12: Es 11 repe		3-4 lent = 1686 µL	4-8 ufc	37	0
17	13: 48 ufc diana		5 lent = 2810 µL	7-14 ufc	51	0
	14: Es 13 repe		5 lent = 2810 µL	7-14 ufc	99	0
18	15: 48 ufc diana		10 lent = 5620 µL	16-32 ufc	165	0
	16: Es 15 repe		10 lent = 5620 µL	16-32 ufc	153	0
19	17: 64 ufc diana		15 lent = 8430 µL	24-48 ufc	243	0
	18: Es 17 repe		15 lent = 8430 µL	24-48 ufc	220	0
20	19: 64 ufc diana		20 lent = 11240 µL	32-64 ufc	229	0
	20: Es 19 repe		No queda suficiente inóculo para otras 20 lent →	11 lent = 6182 µL	18-36 ufc	170

Diana: *Clostridium perfringens* (1,58 ± 0,58) x 10³ ufc/lent La mayor velocidad en el segundo experimento permite obtener valores reales superiores a los teóricos * donde 1 es el valor teórico para MF (al filtrarse 50 mL) y 2 el valor teórico para QPA (al analizarse 100 mL); y así en todas las muestras 11-20

Notas e incidencias: Con *Cl.perfringens* empleamos en su disolución tubos repletos FTM en vez de Salina, al ser anaerobio; con las demás, salina marina al 0,9%.

Las botellas han de quedar con 300 mL, no con 1 L, al mirarse en 100 mL en los 2 QPA y en 50 mL en las 2 placas por filtración

****Todo incubado a 44°C, todo medido en bolsas de anaerobiosis al final de todas las filtraciones y todos los QPA sembrados tras filtrar, dejando la botellas oxigenándose**

Usar Anaerokit con Anaerotest para atmósfera de anaerobiosis en placas y luego confirmar colonias con M-Ident

En el experimento 2, nombramos las muestras de la 11 a la 40, ya que no repetimos negativos (ya hechos en las muestras 1-10 del experimento 1), lo que nos deja tiempo para duplicar positivos con el método de anaerobiosis inmediatamente después de filtrar. **La baja precisión entre réplicas se debe a la no agitación de la muestra para no oxigenarla**

Usaremos 64 lentículas diana: metemos 32 por tubo 18 mL FTM y obtenemos 2 tubos, cada uno con 1,78 lentículas/mL, de modo que 1 lentícula son 562 µL

Diferencia abismal entre el método QPA, que detecta linealmente en todos los rangos de recuento (desde 1 hasta 243 ufc) y el método de filtración, que no detecta nunca nada

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO: *Clostridium perfringens* Agua mineral envasada **POSITIVOS-1**
 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 24h y 48h a 44°C FECHA: 17-18/1/2022 **EXPERIMENTO 2 SIN ANAEROBIOISIS INMEDIATA****

BOTELLA	MATRICES Y CEPAS EN 3 RANGOS		INÓCULOS Y RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS			
	VALOR IDEAL:	MOTIVO:	Cálculos/botella	Inóculo/placa	QPA-TSC 24h	Ecoplaquis SPS 48 h
21	1: 1-3 diana	Rango bajo	1 lent = 473 µL	1-3 ufc	22	0
	2: Es 1 repe membrana abajo		1 lent = 473 µL	1-3 ufc	25	0
22	3: 0 diana (BLANCO)		0 lent = 0 µL	0 ufc	0	0
	4: Es 3 repe membrana abajo		0 lent = 0 µL	0 ufc	0	0
23	5: 1-3 diana		1 lent = 473 µL	1-3 ufc	21	0
	6: Es 5 repe membrana abajo		1 lent = 473 µL	1-3 ufc	13	0
24	7: 3-6 diana	Rango medio	2 lent = 947 µL	3-6 ufc	27	0
	8: Es 7 repe membrana abajo		2 lent = 947 µL	3-6 ufc	47	0
25	9: 4-9 diana		3 lent = 1421 µL	4-9 ufc	8	0
	10: Es 9 repe membrana abajo		3 lent = 1421 µL	4-9 ufc	63	0
26	11: 6-12 diana		4 lent = 1895 µL	6-12 ufc	46	0
	12: Es 11 repe membrana abajo		4 lent = 1895 µL	6-12 ufc	78	0
27	13: 8-16 diana	5 lent = 2368 µL	8-16 ufc	68	0	
	14: Es 13 repe membrana abajo	5 lent = 2368 µL	8-16 ufc	101	0	
28	15: 9-18 diana	Rango alto	6 lent = 2842 µL	9-18 ufc	95	0
	16: Es 15 repe membrana abajo		6 lent = 2842 µL	9-18 ufc	80	0
29	17: 11-22 diana		7 lent = 3316 µL	11-22 ufc	91	0
	18: Es 17 repe membrana abajo		7 lent = 3316 µL	11-22 ufc	102	0
30	19: 12-24 diana		8 lent = 3789 µL	12-24 ufc	143	0
	20: Es 19 repe membrana abajo		8 lent = 3789 µL	12-24 ufc	107	0

Diana: *Clostridium perfringens* (1,58 ± 0,58) x 10³ ufc/lent

Interf: Nos los ahorramos, ya que sabemos por el experimento1 que a 44°C no van a crecer

Notas e incidencias: Si en el experimento 1, con 4 lenticulas enteras por botella (1 lenticula por submuestra) salieron 13 colonias en QPA, haciendo el experimento 2-A de forma análoga, necesitaremos 10 lenticulas por submuestra (40 lenticulas por botella) para obtener 130 colonias en QPA..

****Todo incubado a 44°C, todo medido en bolsas de anaerobiosis al final de todas las filtraciones y todos los QPA sembrados tras filtrar, dejando la botellas oxigenándose**

Probar en cada réplica: una membrana hacia arriba y otra hacia abajo (sólo en los positivos) a ver si mejoran los resultados con las membranas hacia abajo

Usaremos 76 lenticulas; metemos 38 por cada tubo FTM de 18 mL, y obtendremos 2 tubos de FTM 18 mL, cada uno con 2,11 lenticulas /mL, de modo que una lenticula serán 473 µL

Los resultados obtenidos están 1 log por encima de los valores calculados, por que al haber 3 analistas en la validación en vez de 2, el tiempo de espera de cada muestra para entrar en anaerobiosis (a pesar de haber dejado para el final todas las muestras acumuladas para meter en bolsas) ha sido muy inferior al del experimento 1, en el que sólo había 2 analistas

Diferencia abismal entre el método QPA, que detecta linealmente en todos los rangos de recuento (desde 1 hasta 143 ufc) y el método de filtración, que no detecta nunca nada.

La baja precisión entre réplicas se debe a la no agitación de la muestra, para evitar oxigenarla

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO: *Clostridium perfringens* Agua mineral envasada **POSITIVOS-2**
 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 24h y 48h a 44°C FECHA: 17-18/1/2022 **EXPERIMENTO 2** **CON ANAEROBIOSIS INMEDIATA****

BOTELLA	MATRICES Y CEPAS EN 3 RANGOS		INÓCULOS Y RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS			
	VALOR IDEAL:	MOTIVO:	Cálculos/botella	Inóculo/placa	QPA-TSC 24h	Ecoplaquis SPS 48 h
31	1: 6-12 diana	Rango bajo	144 µL	6-12 ufc	1	0
	2: Es 1 repe membrana abajo		144 µL	6-12 ufc	5	0
32	3: 8-16 diana		192 µL	8-16 ufc	6	0
	4: Es 3 repe membrana abajo		192 µL	8-16 ufc	2	0
33	5: 10-20 diana		240 µL	10-20 ufc	1	0
	6: Es 5 repe membrana abajo		240 µL	10-20 ufc	2	0
44	7: 15-30 diana	Rango medio	360 µL	15-30 ufc	5	0
	8: Es 7 repe membrana abajo		360 µL	15-30 ufc	6	0
35	9: 25-50 diana		600 µL	25-50 ufc	1	0
	10: Es 9 repe membrana abajo		600 µL	25-50 ufc	14	0
36	11: 40-80 diana		960 µL	40-80 ufc	2	0
	12: Es 11 repe membrana abajo		960 µL	40-80 ufc	13	0
37	13: 50-100 diana	1200 µL	50-100 ufc	12	0	
	14: Es 13 repe membrana abajo	1200 µL	50-100 ufc	4	0	
38	15: 60-120 diana	Rango alto	1440 µL	60-120 ufc	11	0
	16: Es 15 repe membrana abajo		1440 µL	60-120 ufc	20	0
39	17: 80-160 diana		1920 µL	80-160 ufc	32	0
	18: Es 17 repe membrana abajo		1920 µL	80-160 ufc	10	0
40	19: 100-200 diana		2400 µL	100-200 ufc	8	0
	20: Es 19 repe membrana abajo		2400 µL	100-200 ufc	32	0

Diana: *Clostridium perfringens* (1,58 ± 0,58) x 10³ ufc/lent

Interf: Nos los ahorramos, ya que sabemos por el experimento 1 que a 44°C no van a crecer

Notas e incidencias: ******Todo incubado a 44°C, todo sembrado inmediatamente después de inocular; todas las placas medidas en bolsas de anaerobiosis inmediatamente tras cada filtración; y todos los QPA sembrados en paralelo a las filtraciones nada más inocular.

Probar en cada réplica: una membrana hacia arriba y otra hacia abajo (sólo en los positivos) a ver si mejoran los resultados con las membranas hacia abajo

Usaremos 3 lenticulas: metemos las 3 en un tubo FTM de 18 mL y obtendremos 4500 ufc/tubo 18 mL, que son 4 µL/ufc

Efectivamente con este método de anaerobiosis inmediata se demuestra que lo que destruyó al menos 2 log la carga del experimento 1 fué el dilatado tiempo entre que se filtraban las muestras y se metían las placas en anaerobiosis (hasta 2 h en las muestras del principio). Aún así, se obtienen resultados >1 log por debajo de los valores calculados.

Diferencia abismal entre el método QPA, que detecta linealmente en todos los rangos de recuento (desde 1 hasta 32 ufc) y el método de filtración, que no detecta nunca nada ni siquiera poniendo en anaerobiosis las placas en escasos segundos tras la filtración. La baja precisión entre réplicas se debe a la no agitación de la muestra para evitar oxigenarla

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: no hemos agitado cada botella con inóculo para evitar la letal oxigenación de las dianas, sólo las hemos volteado, de modo que hay muestras con 8 ufc/100 mL y su réplica de la misma botella con 63 ufc/100 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 calculado 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 durante la validación, al comparar el valor certificado de la cepa con placas de 90 mm y con placas de 55 mm, en SPS Agar de Microkit y en el fabricado por el laboratorio, no se ha recuperado ni una sola colonia diana, ni siquiera en los negros a los que se aplicó anaerobiosis inmediatamente después de sembrar. Esto se debe a haber intentado hacer negros sólo en el rango bajo de recuento. Si el método de siembra en superficie (cuanto ni más el de filtración) ya reduce al menos 2 log el resultado con respecto al valor inóculo, deberíamos haber hecho negros en los rangos altos. Pero 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 consensuado aberrante. Los participantes deben estar al tanto y si se producen casos como el mencionado, protestar a la organización del servicio por haberles descalificado o calificado negativamente, cuando deberían ser felicitados por obtener los mejores resultados

de todos los participantes (aunque se llaman servicios intercomparativos precisamente porque comparan laboratorios, independientemente de que los demás lo hayan hecho muy mal).

- h) El coeficiente de variación (CV %) resulta de dividir la desviación estándar global obtenida en el estudio por el valor medio obtenido en el mismo. Se emplea para asignar un valor de “incertidumbre microbiológica medible” en las cepas cuantitativas.

Para aprobar o no la validación del método de recuento de *Clostridium perfringens*, 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 Clostridium perfringens* 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 los resultados, 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 *Clostridium perfringens* 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. Aunque el método Quanti-P/A Clostricult, al tener mucha más superficie que una placa de 55 mm, incluso más del doble que una placa de 90 mm, podría subir a 300 colonias/bolsa y más.

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: realmente da igual que haya 3 o que haya 300, en ambos casos la muestra no sería aceptable.

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 *Clostridium perfringens* 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 todos los parámetros microbiológicos, 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 hemos podido demostrar que hemos sido perfectamente capaces de detectar desde la teórica 1 ufc/100 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; incluso cuando sólo demostramos que hemos conseguido detectar desde 6 ufc/100 mL, 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 muy bajos, desde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10 ufc/100 mL, porque en la mayoría de validaciones más estrictas, se demuestra la capacidad de encontrar 6 ufc. En el primer experimento el corrimiento hacia el rango bajo nos jugó una mala pasada, pero las correcciones del segundo experimento nos han permitido llegar a estos niveles tan increíbles e inimitables. En realidad, lo que sucede es que si hemos calculado que inoculamos 1 ufc y nos crecen 16 colonias, había al menos 16 ufc en el inóculo, de modo que lo único que demostramos es que somos capaces de detectar los valores más bajos inoculables.

En cuanto al límite superior de cuantificación, inoculamos un máximo calculado de 100 ufc/100 mL, pero en realidad la bolsa QPA con más colonias tenía 243, por lo que realmente demostramos que somos capaces de contar esas cifras (e incluso más, sólo es cuestión de paciencia). Eso no significa que no seamos capaces de detectar valores más cercanos al teórico 300 ufc/100 mL que pensamos que puede contar sin error el método QPA, sólo significa que tampoco hemos conseguido inóculos que realmente tuvieran 300 ufc/100 mL (esos sí que repitiendo el experimento varias veces, quizá podríamos conseguirlos y que las ufc en el agua realmente llegasen a ser unicelulares, aunque es muy difícil en un anaerobio estricto para el que no podemos homogeneizar la muestra por agitación; pero no tiene sentido cuando lo que estamos demostrando aquí es que somos capaces de detectar *Clostridium perfringens* cuando están presentes, hay muchos, o haya pocos. Y es que nos han convertido por Ley un método cualitativo: “no debe haber ni una sola célula de *Clostridium perfringens* en 50-100 mL de

muestra de agua” 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 también nos serviremos de ella para obtener más valores que comparar.

▪ Exactitud (recuperación relativa respecto al valor inóculo)

En esta validación va a ser la única exactitud que será posible calcular, dado que el método oficial no ha detectado nada y no podemos comparar con valores cero que, además, sabemos que son falsos. Estos son los datos de recuperación respecto al inóculo de las cepas diana; lógicamente hemos de fiarnos más de las colonias crecidas que de los cálculos de los inóculos, dada la enorme incertidumbre del recuento de anaerobios estrictos en una atmósfera tan oxidante/letal para ellos como es la que respiramos:

-SPS Agar por filtración de membrana a sus 48 horas: en todas las muestras positivas, tanto en el primero como en el segundo experimento, hayamos puesto la membrana hacia arriba o hacia abajo, los recuentos son un aberrante 0 ufc/50 mL, cuando sabemos que hemos inoculado diferente número de ufc en todas esas muestras.

-Quanti-P/A Clostricult TSC Agar: Las recuperaciones medias respecto al valor inóculo son, en las muestras para límite de detección, experimento 1, de 5 colonias de 544 calculadas (0,9%); mientras en el experimento 2, obtenemos lo inverso, 1703 colonias de 173 calculadas (984%). Son datos demasiado dispersos y contradictorios como para extraer conclusiones de los mismos, que en realidad

lo que están midiendo más que la exactitud del método, es el tiempo de exposición de las ufc al letal oxígeno del aire. En las muestras aprovechables positivas, en el experimento 1 sin apresurarnos a pasar las muestras inoculadas a las bolsas QPA, 18 colonias de 736 calculadas (2,4%); en el experimento 2, las muestras en las que no nos apresuramos en pasar las muestras inoculadas a las bolsas QPA, sin anaerobiosis inmediata, 1.137 colonias/120 ufc calculadas (947,5%); y en el experimento 2, las muestras donde sí que nos apresuramos a meter en bolsa nada más inocularlas, 187 colonias /788 calculadas (23,73%), de modo que si hiciéramos de modo simplista (ya que no tenemos otra manera de medir, al no haber valores inóculo de referencia fiables ni comparables con nada, por eso hablamos de “ufc calculadas” en vez de “ufc inoculadas”) una media entre todas estas recuperaciones, obtendríamos una recuperación relativa respecto al valor calculado de 391,7%, que supera en sólo 24 h el 70% aplicable en medios selectivos y por supuesto el 50% aplicable en validaciones de menor exigencia, incluso el 95% de los baremos más estrictos. Pero definitivamente este valor del 391,7% de exactitud relativa no tiene significado alguno, ya que si los cálculos hubieran sido diferentes, también lo sería este valor.

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 QPA, 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 oxigenación letal.

Por todo ello consideramos que los valores de recuperación relativa en esta validación ayudan a aceptar el método rápido frente al estándar.

Para que los árboles nos dejen ver el bosque, debemos buscar la exactitud absoluta (comparar los recuentos de QPA con los recuentos 0 del método de filtración, que para eso es el método oficial y único valor estándar con el que podemos comparar el método QPA).

▪ 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 QPA con respecto el SPS Agar por filtración:

Medio	Exactitud medida como recuperación absoluta
QPA 24h/ Filtración SPS 48h en tabla positivos 1 (anaerobiosis retrasada)	18 colonias/0 colonias = ∞ %
QPA 24h/ Filtración SPS 48h en tabla positivos 2-A (anaerobiosis retrasada)	1.137 colonias/0 colonias = ∞ %
QPA 24h/ Filtración SPS 48h en tabla positivos 2-B (anaerobiosis inmediata)	187 colonias/0 colonias = ∞ %
QPA 24h/ Filtración SPS 48h en tabla límites cuantif.1	5 colonias/0 colonias = ∞ %
QPA 24h/ Filtración SPS 48h en tabla límites cuantif.2	134 colonias/0 colonias = ∞ %

Aunque estos datos tampoco nos dejan realizar estadística, no es culpa del método alternativo, sino del método oficial. La realidad es que el QPA Agar recupera en sólo 24 h, más colonias que el método oficial de filtración de membrana en 48h y aunque no podamos indicar un % real, eso no desvirtúa esta realidad. Esto concuerda con otras validaciones de este mismo método rápido, donde el QPA siempre obtiene en la mitad de tiempo resultados adecuados (>50%), óptimos (>70%) e incluso, muy superiores (más reales, dado que no son falsos positivos) a los obtenidos en 48 h con filtración en SPS Agar. Tampoco es necesario decir más, cuando la legislación exige 0 ufc/50-100 mL, de modo que nos da igual que haya 5 que 240 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 mismos motivos.

Lo máximo que se podría pedir es que dividamos por 2 todos los valores obtenidos con QPA ya que había el doble de muestra (100 mL) que en en las placas de SPS por filtración (50 mL). Pero el resultado al aplicar esta corrección es idéntico:

Concluimos ante ambas formas de medir la exactitud (relativa y absoluta), aunque no obtengamos un número porcentual (sólo un “infinitamente mejor”), que el método que mejor se comporta ha sido el QPA-TSC de 24 horas, al recuperar más que el método oficial de filtración en SPS Agar en 48h y encima en la mitad de tiempo.

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 las réplicas de muestras teóricamente idénticas (misma botella, aunque ésta no se pueda agitar para minimizar su oxigenación letal), 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.

Sabemos de antemano que la precisión en esta validación será muy mala, ya que hemos preferido conseguir la mejor exactitud posible, agitando poco las botellas inoculadas, para que primase la cercanía de los resultados a la realidad, sobre la cercanía de resultados entre réplicas.

▪ Precisión en SPS Agar en 48h por filtración en las réplicas de muestras idénticas

No tiene sentido decir que la precisión de este método es magnífica porque todos los recuentos sean 0 ufc/50 mL

▪ Precisión en QPA-TSC Agar en 24h en las réplicas de muestras idénticas

Tenemos en cuenta sólo las tablas de positivos del experimento 2, al ser las únicas con datos duplicados fiables, tanto si hay anaerobiosis demorada como si la hay inmediata. Podríamos hacerlo sin estudiar ambos datos por separado, ya que la precisión depende de la agitación de la botella y no del tiempo que demoremos en pasar de la inoculación al análisis. Pero como los valores inóculo calculados son diferentes en ambos ensayos, hemos de hacerlo por separado:

Rango de Medida	Tabla positivos X_{21} - X_{30} (anaerobiosis demorada)	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
1 ufc/100 mL	22-25 21-13	2,12 5,66	9% 33%
3-8 ufc/100mL	27-47 8-63 46-78 68-101	14,14 23,9 22,63 22,82	38,22% 65,93% 36,5% 31,16%
9-12 ufc/100mL	95-80 91-102 143-107	10,61 7,78 25,46	12,13% 8,06% 20,36%
Precisión media en todos los rangos			28,26%

Rango de Medida	Tabla positivos X_{21} - X_{30} (anaerobiosis inmediata)	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
6-10 ufc/100 mL	1-5 6-2 1-2	2,83 2,83 0,71	94,33% 70,75% 47,14%
15-50 ufc/100mL	5-6 1-14 2-13 12-4	0,71 9,19 7,78 5,66	12,91% 122,53% 103,73% 70,71%
60-100 ufc/100mL	11-20 32-10 8-32	6,36 15,56 16,97	41% 74,10% 84,85%
Precisión media en todos los rangos			72,20%

La dispersión se aprecia más alta en los rangos realmente más bajos, es decir, en los valores encontrados más bajos (que han sido los de anaerobiosis inmediata, sin que esta tenga nada que ver en la dispersión)

- 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. Sin embargo, en esta validación, al no haber podido agitar para homogeneizar las muestras de agua con los inóculos, salen dispersiones muy elevadas en todos los rangos, aunque mayores en los recuentos más bajos (que casualmente corresponden a los datos con anaerobiosis aplicada inmediatamente).

Una precisión inferior al 25% (como la obtenida en 5 de las 20 submuestras) es la cumbre de la excelencia en precisión microbiológica.

Una precisión inferior al 50% (como la obtenida en 12 de las 20 submuestras) es el siguiente baremo de excelencia en precisión microbiológica.

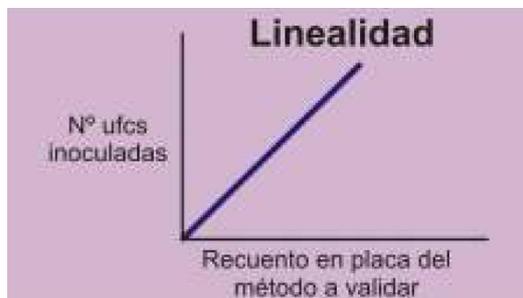
En general, la precisión depende mucho más del rango de recuento que del medio empleado. Y en este caso, depende aún más de la ausencia de agitación de las muestras para evitar oxigenar el agua.

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 para el método QPA porque las medias obtenidas son coherentes con los valores inóculo calculados, en cada uno de los rangos.

Rango de Medida	Rtos. medios
1-4 ufc/100 mL tabla limites experimento 2	31 colonias/placa
7-32 ufc/100mL tabla limites experimento 2	166 colonias/placa
1 ufc/100mL tabla positivos anaerobiosis demorada experimento 2	20 colonias/placa
3-8 ufc/100mL tabla positivos anaerobiosis demorada experimento 2	55 colonias/placa
9-12 ufc/100mL tabla positivos anaerobiosis demorada experimento 2	103 colonias/placa
6-10 ufc/100mL tabla positivos anaerobiosis inmediata experimento 2	3 colonias/placa
15-50 ufc/100mL tabla positivos anaerobiosis inmediata experimento 2	7 colonias/placa
60-200 ufc/100mL tabla positivos anaerobiosis inmediata experimento 2	19 colonias/placa

La linealidad del recuento en QPA queda demostrada en los tres ensayos independientes de los que hay datos suficientes para expresarla: se nota como sube el número de colonias obtenidas de forma proporcional conforme sube el número de ufc inoculadas/calculadas.

Como siempre suele suceder en microbiología, la linealidad es adecuada en los recuentos en placa (en este caso en bolsa QPA), no observándose valores lejanos a lo esperado, y subiendo el número de colonias/placa proporcionalmente a como suben las ufc/100 mL.

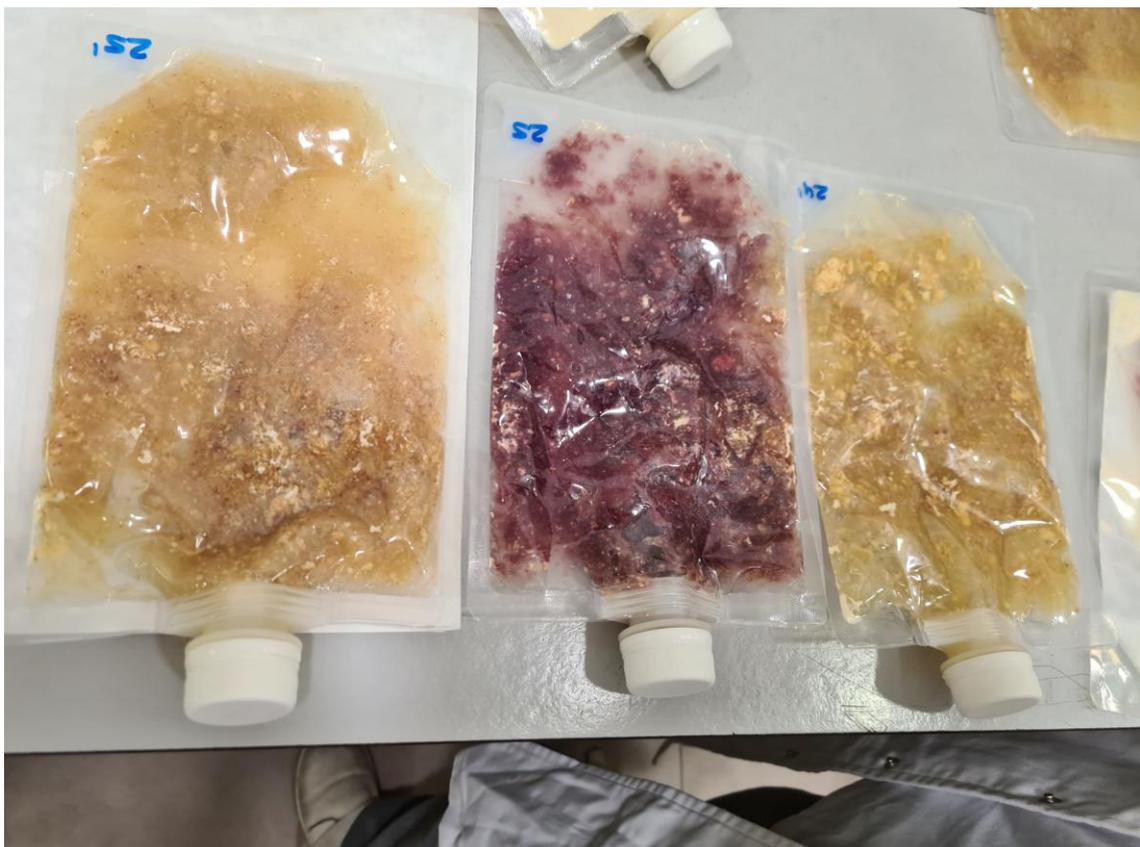
8.5 Selectividad inclusiva (Inclusividad): escasez de falsos negativos. Se extraen los datos de las dos tablas de positivos del experimento 2. En el 100% de los casos han sido correctamente detectadas las muestras positivas (que contenían cepa diana de *Clostridium perfringens*) cuando estaban presentes en cualquier rango. Se demuestra así la selectividad inclusiva del 100% para el método QPA. El método oficial de filtración queda invalidado al obtener nada menos que el 100% de falsos negativos: ni una sola muestra positiva ha sido detectada como tal. Esto es más habitual de lo que parece en la inmensa mayoría de laboratorios, como sabemos bien al ser coordinadores de ensayos intercomparativos de aguas.

8.6 Especificidad exclusiva (Exclusividad): escasez de falsos positivos con diferentes interferentes. Se extraen los datos de la tabla de negativos (falsos positivos) del experimento 1 y de la tabla de positivos en los que había además interferentes del mismo experimento 1. Observamos diferencias entre los dos métodos. Así como el QPA sólo obtiene falsos positivos a 37°C (con las 3 cepas interferentes) y nunca a 44°C; el método de filtración en placas de SPS obtiene esos mismos falsos positivos a 37°C y, además, con 1 de las 3 cepas interferentes (*Enterococcus faecalis*) a 44°C. Lo cual lleva a tener que emplear kits de identificación en el caso de las placas de filtración y a no tener que emplearlos en el caso de las bolsas QPA. Se demuestra así la especificidad exclusiva del 100% para el método QPA con TSC Agar en 24h

siempre que se incuba a 44°C. El método de filtración en SPS de 48 horas no es capaz de diferenciar las colonias diana de las interferentes, por lo que no resulta exclusivo.

8.7 Robustez del parámetro *Clostridium perfringens*: precisión entre los resultados de exactitud de los diferentes métodos ensayados.

Claramente se vuelve a demostrar, como en intercomparación, que es el parámetro microbiológico menos robusto de cuantos analizamos en aguas, ya que los resultados de un método (filtración en placas de SPS) y del otro (Quanti-P/A Clostricult) no se parecen en nada. Es más, si comparamos los resultados de un mismo método un día (experimento1) con los de otro día (experimento 2) en algo parecido a la reproducibilidad, también hay serias variaciones de recuento en función del tiempo en que transcurre desde que hemos inoculado las dianas y hemos sembrado para incubar las bolsas QPA; porque cuanto más tiempo transcurre, más se oxigenan en el agua de muestra las células diana inoculadas; no así una vez inoculadas las muestras de agua con diana en las bolsas, ya que el medio genera anaerobiosis, como se demuestra por el hecho de que las muestras que al inocularse han enrojecido el medio QPA (lo han oxigenado en exceso), tras la incubación han revertido su viraje de la resazurina del medio, señal de que el oxígeno ha sido destruido.



Centro: bolsa QPA con agua demasiado oxigenada. El medio nos chiva que hay demasiado oxígeno, aunque tiempo después desaparece el color rojo porque el medio ha destruido el oxígeno, permitiendo el crecimiento de las ufc diana

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.

Descubrimos en este parámetro otra componente adicional de la incertidumbre microbiológica que no se puede medir adecuadamente: el tiempo transcurrido desde la inoculación de las cepas anaerobias estrictas hasta su inclusión en atmósfera anaerobiosis (sean placas en bolsa de anaerobiosis, sean bolsas QPA que ya llevan incorporado el mismo generador de anaerobiosis)

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 Estreptococos fecales asociados a animales, cuando ambos indican exactamente lo mismo: infiltración de aguas residuales; otro ejemplo: fosfatasa ácida en *Clostridium perfringens* con reactivos cancerígenos, cuando en realidad nos da igual que sea o no perfringens, ya que todas las esporas de Clostridium en un agua son indicadoras de infiltración de aguas naturales sucias, no filtradas). En el caso de los Enterococos, la Norma olvida la prueba más evidente y rápida, ya que los enterococos fecales son los únicos aerobios (facultativamente anaerobios en este caso) que son catalasa negativos: sus colonias no 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 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.

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**”.

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

La **exactitud** del método QPA-TSC Agar 24h, medida como recuperación relativa al valor inóculo y además como recuperación absoluta respecto al método oficial, no puede ser evaluada con un número % en la presente validación, ya que no se obtienen valores de referencia serios en el método oficial que permitan compararse estadísticamente con el método validado; y los valores inóculo calculados demuestran no ser fiables, al depender los resultados más del tiempo transcurrido durante el análisis (en el que el oxígeno del aire está destruyendo células diana) y de otros factores poco conocidos, que del número real de ufc inoculadas. Sabemos por intercomparación que no es un fenómeno aislado y que siempre caen nada menos que 1-3 log los recuentos encontrados en este parámetro microbiológico, desde la realidad inoculada. Sólo podemos afirmar que hemos demostrado que el método QPA es “infinitamente” más exacto que el método oficial de filtración de membrana, ya que ha detectado el 100% de muestras positivas mientras el método oficial no ha sido capaz de detectar ni una sola. Y además tardando la mitad de tiempo en la incubación, lo que ahorra 1 día de stock de cuarentena en almacén, con el espacio y dinero que eso supone.

La **precisión** medida como CV %, no llega a un nivel inadmisibile del 90%, por lo que cumple el criterio de aceptabilidad en el método QPA. En este parámetro no tiene mucho sentido buscar una precisión mejor, dado que no se pueden homogeneizar-agitar las muestras con el inóculo, sin que ello genere su oxigenación y por tanto, una caída en picado de la supervivencia de la cepa diana. De hecho las mismas cepas comerciales de *Clostridium perfringens* tienen la imprecisión máxima con respecto a las demás cepas (CV 50-101%, según el lote que sea, frente al 8-25% de la mayoría de otras cepas)

La **Linealidad**, la **Selectividad inclusiva**, la **Especificidad exclusiva** y la **Robustez paramétrica** han quedado excelentemente demostradas en el método QPA-TSC.

Por todo ello, se considera validado el parámetro de recuento de *Clostridium perfringens* en aguas envasadas con el método de recuento rápido QPA-TSC 24h, mientras el método oficial de filtración de membrana en SPS nos atrevemos a decir que queda radicalmente invalidado por no cumplir ni uno solo de los criterios de aceptabilidad de la calidad de un análisis, de modo que podemos y debemos usar QPA desde el mismo instante en que conozcamos este informe.

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, 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 *Clostridium perfringens* en aguas.
- Validación de análisis de aguas. 11 pp. MICROKIT © 09-Julio-2009
- MICROKIT. Validación del método QPA-Clostricult-TSC en aguas de consumo humano frente al método oficial de filtración de membrana en placas de TSC Agar y de Cromokit-CP Agar. www.microkit.es 6-Nov-2018
- Ielab. Validación intercolaborativa por diversos laboratorios acreditados ISO 17025, del método Clostricult de MICROKIT en aguas de consumo humano frente al método oficial de filtración de membrana en todos los medios disponibles en placa. www.microkit.es 23-Mayo-2011

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: Anónimo

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



20 de Enero de 2022

ANEXO 1

Estudio de las Posibles causas de aparición de resultados anómalos

La bajada de los recuentos de las dianas obtenida en *Clostridium perfringens* no es una anomalía que haya aparecido en esta validación, sino que llevamos más de 20 años detectándola en intercomparación, estudiando sus causas y por eso ideamos un método alternativo que funcionase seriamente, tanto cualitativo (Clostricult P/A) como posteriormente, cuantitativo (QPA-Clostricult). 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 que el método oficial no tiene en cuenta que estamos tratando de detectar bacterias anaerobias estrictas en una atmósfera fuertemente oxidante, y sólo lo recuerda a lo largo de la incubación de las placas (atmósfera de anaerobiosis), olvidando por completo que durante el análisis por filtración estamos destruyendo células diana cada segundo que transcurre, máxime al hiper-oxigenarlas por el método de filtración de membrana (ver la primera fotografía de esta validación en la página 2).

ANEXO 2

Propuestas de mejora para próximas validaciones

Consideramos 100% correcto todo lo aplicado

ANEXO 3

Fotografías de la validación no anexadas en el texto



Modo de empleo QPA, Paso 1: Doblar el fondo de la bolsa para que no contenga medio de cultivo en polvo, ya que luego formaría grumos



Modo de empleo QPA, Paso 2: Abrir el tapón con el fondo de la bolsa doblado y el medio en polvo encima del doblez



Modo de empleo QPA, Paso 3: Añadir 100 mL de muestra de agua cuidando que no rebose y manteniendo el fondo doblado



Modo de empleo QPA, Paso 4: Cerrar el tapón a rosca con fuerza, dejando la mínima cámara posible de aire,



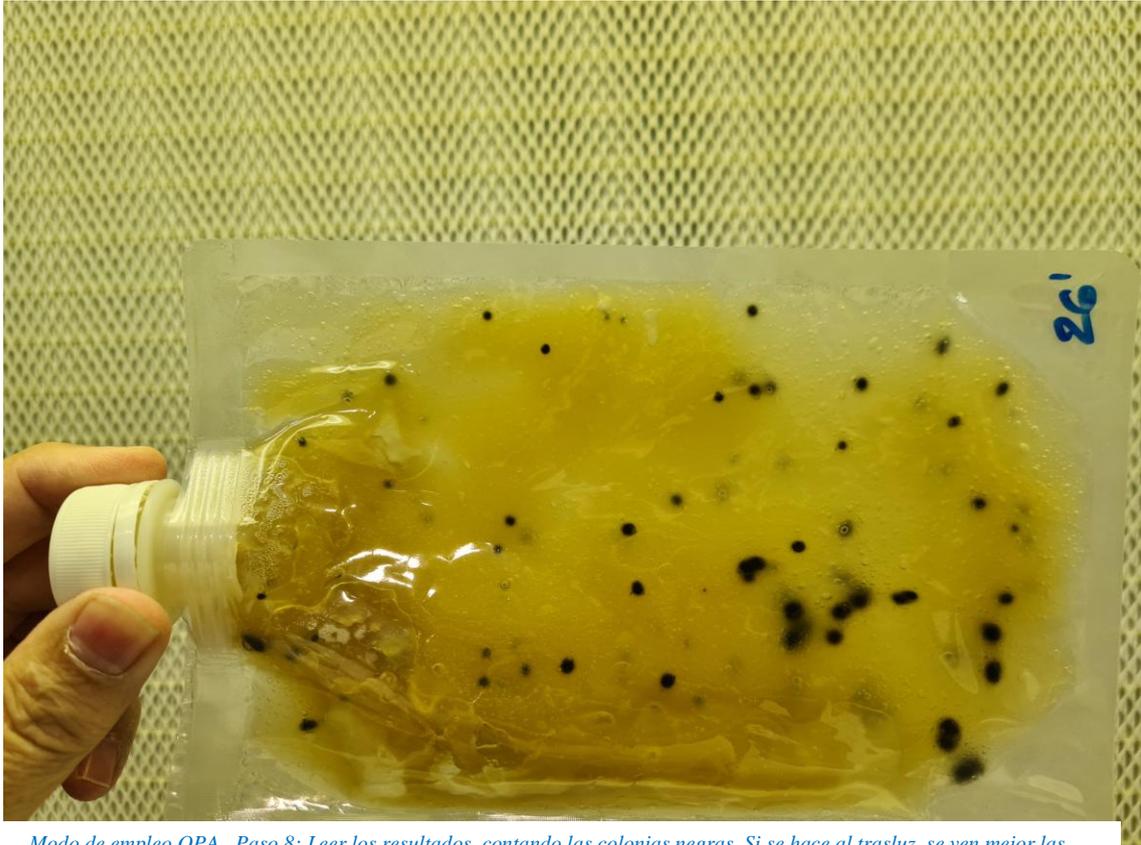
Modo de empleo QPA, Paso 5: Amasar con las dos manos para mezclar la muestra de agua con el medio en polvo, Puede doblarse la bolsa con fuerza para acelerar la homogeneización. Los grumos desaparecerán durante la incubación



Modo de empleo QPA, Paso 6: Planchar las bolsas para que la capa de medio quede fina y lo más homogénea posible, y luego se lean mejor las colonias sin necesidad de tener que dar vueltas a la bolsa,



Modo de empleo QPA, Paso 7: Apilar las bolsas en la estufa, alternando el lado del tapón y buscando la estabilidad de la pila. Incubar 24 horas a 44°C



Modo de empleo QPA, Paso 8: Leer los resultados, contando las colonias negras. Si se hace al trasluz, se ven mejor las colonias del fondo del medio, lo que ahorra dar la vuelta a la bolsa y contar colonias dos veces. Si se desea identificar, abrir el tapón y pescar colonias con un asa de siembra



Obtención de positivos tras la incubación

ANEXO 4

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

Ver aparte