

CERTIFICADO DE VALIDACIÓN QUANTI-P/A CP



Certificamos que los métodos y productos:

QUANTI-P/A-CP de MICROKIT (Agar TSC en él empleado: Ref.MICROKIT DMT175 con gel Hidragar MICROKIT), **Cromokit-C.perfringens Agar** y **Clostricult P/A** cumplen con los estándares de VALIDACIÓN en base a la Norma UNE-EN-ISO 16140:2003/A1:2012, cuyos resultados se anexan. La validación ha sido realizada mediante comparación por el método de pares, frente a los métodos oficiales de referencia: ISO 11133 de control de calidad de medios de cultivo, ISO 14189:2013 de Recuento de *Clostridium perfringens* por el método de filtración en membrana, Directiva UE 7.10.2015 de aguas de consumo humano, BOE 185 de 1 de agosto de 2018 (Real Decreto 902/2018, de 20 de julio), por el que se modifican el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, y las especificaciones de los métodos de análisis del Real Decreto 1798/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula la explotación y comercialización de aguas minerales naturales y aguas de manantial envasadas para consumo humano, y del Real Decreto 1799/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula el proceso de elaboración y comercialización de aguas preparadas envasadas para el consumo humano. Y con cepas cuantitativas de referencia diana, interferentes y acompañantes. Las validaciones de MICROKIT son inspeccionadas y certificadas en el alcance por terceros (SGS y Pryma calidad en sus auditorías ISO 9001), tal y como establece el reglamento CE 2073/2005 de validación respaldada por terceros.

Esta validación interna e intercomparativa ha sido elevada a intercolaborativa en colaboración con un laboratorio externo que ha participado en la misma, en muestras naturales de aguas de consumo humano, de las que analiza rutinariamente, comparando los resultados Quanti-P/A-CP con los del método estándar (placas TSC Agar por filtración de membrana) y otros (placas Cromokit-C.perfringens Agar por filtración de membrana y Método Clostricult P/A).

El presente certificado sólo es válido durante el periodo de vigencia de los métodos citados y aunque se garantiza cuatrimestralmente, mediante revalidación intercomparativa SEILA (para todo tipo de aguas), habrá de ser renovado antes de cinco años desde su fecha de emisión, indicada al pie, si hay cambios de diseño que puedan afectar significativamente los resultados.

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

Garantizado por:

Jorge Sanchis Solera

Coordinador Intercomparativos SEILA y Director de Calidad MICROKIT®

A fecha: 6-Noviembre-2018

Actualizado a fecha: 04/03/2021

INFORME DE VALIDACIÓN CUANTITATIVA:

RECuento DE *Clostridium perfringens* mediante los nuevos métodos Quanti-P/A-CP y Cromokit-*C.perfringens* Agar, frente al método estándar TSC Agar y frente al método validado Clostricult P/A

INDICE:

1-Objetivos

2-Alcance

3-Parámetro 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: propuestas de mejora, fotografías de la validación

12-Personas que han intervenido en la validación, cargos, fechas y Firmas

1. Objetivos

Comprobar si el método de recuento de *Clostridium perfringens* Quanti-P/A-CP, los detecta y enumera adecuadamente en las muestras de agua procesadas, comparando con cepas cuantitativas certificadas (exactitud relativa) y, sobre todo, con los resultados paralelos del método oficial de referencia (exactitud absoluta): Filtración en plaquitas de TSC Agar y confirmación con M-Ident-CP (lactosa, gelatina, nitratos, movilidad) y Clostricult P/A. Aprovecharemos para comprobar si el uso de plaquitas del moderno medio cromogénico Cromokit-CP Agar es también un buen método. Es decir, comprobar que la técnica utilizada, los medios de cultivo utilizados y los analistas que hacen el control rutinario de recuento de *Clostridium perfringens*, son idóneos, con resultados aptos y fiables, y determinar la exactitud y precisión de nuestro método en los rangos de trabajo necesarios, así como la linealidad y el carácter inclusivo (selectividad) y exclusivo (especificidad) del método cuantitativo.

2. Alcance

Las muestras de agua de consumo humano procesadas por ETAP y distribuidas en las redes.

3. Parámetro microbiológico a validar

El parámetro objeto de la presente validación es el recuento de bacterias *Clostridium perfringens*.

4. Diseño del experimento

Realizaremos en un número de 20 muestras, realizando 4 análisis por muestra de 3 opciones: negativos, positivos y positivos débiles (total 240 muestras):

- 1- con el protocolo MF y medio de cultivo habitual: TSC Agar 24h a 44,5°C + confirmación de todos los tipos de colonias encontradas con lactosa, gelatina, nitratos, movilidad y Clostricult P/A. Descartamos la prueba de la fosfatasa ácida porque está dando muy malos resultados en todos los laboratorios consultados. Y descartamos el Agar m-CP, que tan malos resultados ha dado en anteriores validaciones y queda por fin oficialmente descartado tras el BOE 185 de 1 de agosto de 2018 (Real Decreto 902/2018, de 20 de julio)
- 2- con el medio selectivo cromogénico (Cromokit-*C.perfringens* Agar, 24h a 44,5°C),
- 3- con el nuevo formato de TSC Agar en bolsas Quanti-P/A-CP para 100 ml de muestra de agua, 24 h a 44,5°C
- 4- con el clásico Clostricult P/A de MICROKIT, método cualitativo para demostrar ausencia o presencia de *Clostridium perfringens*

Obviamos el uso de muestras previamente calentadas 15 minutos a 70-80 °C para buscar esporas de *C.perfringens*, ya que los inóculos son de cepas en estado vegetativo, no esporulado, de modo que el shock térmico sólo serviría para eliminar o disminuir los inóculos cuantitativos conocidos.

Son todos ellos, métodos basados en la Norma ISO 14189:2013 de Recuento de *Clostridium perfringens* por el método de filtración en membrana, pero optimizada. 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 realizamos anualmente, por lo que al ser éstas menos de 1000, un número de 10 sería adecuado (aunque también 20 muestras será más adecuado para poder estudiar en cada uno de los 3 rangos del recuento en placa, incluido el cero, y eso a pesar del cuadruplicado de métodos).

También podríamos habernos planteado repartir las 30 muestras dividiendo 5 muestras en 6 rangos: 5 con 0 ufc diana (para el estudio de falsos positivos/exclusividad), 5 con 14, 12, 10, 8 y 6 ufc diana respectivamente (para conocer el límite inferior de cuantificación exacto que somos capaces de demostrar y no conformarnos con los 15 ufc estándar por placa), 5 con 16 ufc diana (rango bajo), 5 con 48 ufc diana (rango medio), 5 con 96 ufc diana (rango alto) y 5 con 192 ufc diana (para conocer el límite superior de cuantificación exacto y no conformarnos con los 150 ufc estándar por placa).

Somos conscientes de que en vez de con placas duplicadas es mejor trabajar con placas triplicadas, pero consideramos suficiente en esta validación haber hecho cuadruplicados de métodos y duplicados de muestras para cada método, porque en realidad, al usar 4 medios en 20 muestras cada uno, con de 3 opciones (negativos, positivos y positivos débiles) el número de placas + kits ya se dispara a 240.

Realizaremos pues el análisis de validación en 20 muestras (en realidad 20 x 4 x 3, para calcular la conformidad o precisión cada 2 muestras idénticas), para estudiar también la precisión para cada método; por tanto, para la suma de los 4 métodos necesitaremos 240 muestras de 100 mL y 60 placas/bolsas/viales para cada uno de los 4 métodos.

La **exactitud** se calculará como % de recuperación de colonias diana respecto al valor inóculo que habremos calculado a partir de las cepas inoculadas. En cada rango de recuento en placa. Y como % de recuperación obtenida entre los 4 métodos.

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 de duplicados y además intermétodos, aunque eso hace casi inviable terminar el experimento de inoculación y siembra de la validación en una sola jornada de trabajo. Al día siguiente se leen los resultados y se realizan las confirmaciones.

Para 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 dispone de un analista para microbiología, basta con que el mismo realice los dos experimentos duplicados en dos días diferentes. En este experimento, por imposibilidad técnica, se ha hecho el mismo día por el mismo analista pero con muestras duplicadas en los 4 métodos y con las 3 opciones (negativos, positivos y positivos débiles).

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.

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 sería ideal con 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, objetivamente, no tienen ningún valor dicho cálculo.

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). 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, así como en el medio general (TSA para bacterias o SDA para hongos), estas placas debemos realizarlas en duplicados (incluso sería mejor en quintuplicados con 5 lenticulas), a fin de obtener la desviación estándar además de la media. Se inoculan 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.

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 o bien se analizan todas las muestras antes de la validación y se recuperan, o bien, al ser agua, simplemente se autoclavan previamente, ya que esta esterilización no le cambia las propiedades físico-químicas ni organolépticas. Si se trata de aguas cloradas no necesitamos hacer nada más que almacenarlas en botes durante unas horas, ya que *Clostridium perfringens* quedan inhibidos por el cloro; y este es el caso ideal, ya que conservarían una flora acompañante (quizá incluso interferente), que aun así nos encargaremos de inocular. Después inactivaremos el Cloro con TioSulfato Sódico para que no impida el crecimiento de las cepas inoculadas.

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. Consideramos necesario realizar en validación aparte, las aguas cuyo recuento esperable de *Clostridium perfringens* sea elevado (como las residuales y vertidos, aguas naturales de ríos o playas...), dejando esta 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. Y no

sólo cepas de colección, también si es posible, cepas nativas o salvajes, lo más cercanas posible a la zona geográfica (latitud N/S) donde se realice la validación.

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, 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) debería bajar el rango más alto incluso a 50 (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 hay que 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).

También podemos emplear 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 Solución salina marina al 0,9%, 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 Solución salina marina al 0,9%, 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 dejaríamos así porque de este modo no haría falta jugar con números extraños de μl). En el ejemplo, si vamos a necesitar inocular 1 ml de esta dilución -4 (o mejor 0,1 ml de la dilución -3) en 5 de las 20 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 Solución salina marina al 0,9% de 10 ml de la dilución -4, y esto 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 Solución salina marina al 0,9%) 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.

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. Dada la complicación de esta opción, preferimos añadir solo un acompañante o interferente por muestra, y dejar el mix sólo para las muestras sin diana (en el estudio de negativos).

El experimento se inicia el día 29 de Octubre de 2018, los resultados se leen el 30, las confirmaciones se realizan el 30 y el informe se acaba de redactar para enviar a corrección por parte de la empresa asesora MICROKIT, en su servicio del curso de validación, el día 6 de Noviembre de 2018, que nos lo devuelve corregido y conforme el mismo día 6 de Noviembre de 2018.

5. Herramientas utilizadas

5.1 Material de laboratorio e instrumental necesario

Para la realización de la presente validación es necesaria la utilización del siguiente material de laboratorio:

- Micropipeta rango 100 - 1000µL
- Micropipeta rango 10 - 100µL
- Puntas para micropipeta
- Agitador Vórtex
- Autoclave
- Estufa a $44,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$
- Nevera
- Probetas estériles
- Botes de 100ml estériles con Tiosulfato Na
- Asas de Digrasky estériles
- Alcohol de 70°
- Filtros de membrana de ésteres de celulosa
- Rampa de filtración
- Soportes de filtración
- Bomba de vacío
- Pinzas estériles
- Mechero bunsen
- Contador de colonias
- Asa de platino

5.2 Medios y diluentes a utilizar

Medios y diluyentes MICROKIT	Lote y caducidad
Solución salina marina al 0,9% isotónica 10 mL	Lote: 1806/3187 6; Caducidad: 12/06/2020
Solución salina marina al 0,9% isotónica 9 mL	Lote: 1805/3172 6; Caducidad: 21/05/2020
Botes tomamuestras 100 ml C/Tiosulfato sódico, estériles	Lote: 1810/3040 59; Caducidad: 01/10/2020

QUANTI-P/A-CP	Lote: 1809/3239 6; Caducidad: 11/10/2020
CLOSTRICULT P/A POLVO ESTERIL viales	Lote: 1807/3203 6; Caducidad: 24/07/2021
TSC AGAR cassettes herméticas	Lote: 1809/3238 6; Caducidad: 08/07/2019
CROMOKIT <i>C.perfringens</i> AGAR cassettes herméticas	Lote: 1809/3238 6; Caducidad: 08/07/2019
ANAEROKIT, atmósfera de anaerobiosis en bolsas	Lote: 1802/3120 6; Caducidad: 30/10/2020
Anaerotest	Lote: HC610551

5.3 Material biológico utilizado

Suspensiones de cepas cuantitativas de referencia, trazables, con indicación de su incertidumbre inicial a partir de las cuales se prepara el inóculo. Incluimos dianas, interferentes y acompañantes. Y, si es posible, 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	Desviación	Lote	Caducidad
<i>Clostridium perfringens</i> WDCM 00007	7,42 x 10 ³ ufc/lentícula	·+/- 1,34	14/09/2017-10 ³	14-09-2019
<i>Clostridium perfringens</i> WDCM 00174	9,86·10 ¹ ufc/lentícula	·+/- 5,06	15/06/2017-10 ¹	15-06-2019
<i>Clostridium sporogenes</i> WDCM 00008	1,44x10 ⁶ ufc/lentícula	·+/- 0,63	14/09/2017-10 ⁶	14/09/2019
<i>Salmonella enterica typhimurium</i> WDCM 00031	1,54x10 ⁶ ufc/lentícula	·+/- 0,66	13/03/2017-10 ⁶	13/03/2019
<i>Proteus mirabilis</i> WDCM 00023	1,30x10 ⁵ ufc/lentícula	·+/- 0,30	21/12/2017-10 ⁵	21/12/2019
<i>Bacillus subtilis spizizenii</i> WDCM 00003	5,30·10 ² ufc/lentícula	·+/- 1,80	14/05/2018-10 ³	14/05/2020
<i>Staphylococcus epidermidis</i> WDCM 00132	1,46·10 ⁶ ufc/lentícula	·+/- 0,54	16/11/2017-10 ⁶	16/11/2019

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

Clostridium perfringens son ambas cepas diana y crecen en TSC con colonias pequeñas, negras, que viran a crema e incoloro poco después de sacarlas de la atmósfera de anaerobiosis; en Quanti-P/A, al ser el mismo medio, con colonias negras, grandes, con burbuja de gas en el centro, que no viran de color porque nunca pierden la anaerobiosis; en Clostricult el agua con estas cepas vira a negro (o al menos el fondo del bote con agua); y en Cromokit-*C.perfringens* Agar crecen con colonias naranjas, grandes, que no viran al sacarlas de la atmósfera de anaerobiosis.

Clostridium sporogenes es un interferente, sulfito reductor, aunque difícilmente crece a 44,5°C en cualquiera de los 4 medios.

Salmonella enterica typhimurium es un interferente porque puede crecer en anaerobiosis.

Proteus mirabilis es otro interferente porque puede crecer en anaerobiosis.

Bacillus subtilis spizizenii es un acompañante, porque no puede crecer en anaerobiosis.

Staphylococcus epidermidis es otro acompañante porque raramente puede crecer en anaerobiosis.

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 (hasta 6 cepas en 6 muestras y luego repetir las una por una en las demás muestras).

6. Procedimiento

6.1 Operativa con muestras inoculadas.

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

- Preparamos 240 frascos estériles con 100 mls cada uno de agua potable procedente de la salida de la ETAP. A estos frascos se había añadido anteriormente Tiosulfato Sódico estéril para eliminar el cloro en el agua tratada en la potabilizadora. Los dejamos reposar unos minutos para que actúe el cloro y pierdan la posible presencia de *Clostridium perfringens* y así no obtener positivos en las muestras donde no los inoculemos.
- NOTA: Si queremos estudiar la reproducibilidad, la mitad de los frascos se deben inocular y analizar un día; y la otra mitad, otro día y otro analista, debe inocularlos de forma idéntica, con los mismos lotes y concentraciones de cepas y acto seguido analizarlos. Si solo se dispone de un analista para microbiología, basta con que el mismo haga los ensayos dos días diferentes. Por motivos prácticos se han hecho todos los duplicados por el mismo analista y en el mismo día.
- Reconstituimos las cepas de laboratorio en tubos de 10 mL de Solución salina marina al 0,9% ¼ solución isotónica. Con meticulosidad para no perder ninguna de las lentejas que conforman las mismas, atemperadas para que se disuelvan, y agitando después, con un vortex para conseguir una correcta homogeneización. En los anaerobios estrictos (los tres *Clostridium*) no empleamos el vórtex, para evitar su oxigenación letal, sólo volteamos los tubos varias veces tras la disolución de las lentículas. Realizamos las diluciones decimales pertinentes en tubos de 9 mL de Solución salina marina al 0,9% ¼ solución isotónica.
- Hacemos los cálculos para determinar la cantidad de inóculo que se deberá traspasar a cada frasco para conseguir la cantidad de colonias que queremos en cada placa. Una vez determinado este valor traspasamos dicho volumen de inóculo a los frascos con agua (muestras) con micropipeta y puntas estériles. Tras ello, agitamos las muestras para su correcta homogeneización.
- La concentración teórica de los distintos microorganismos inoculados en las muestras se detalla en la siguiente tabla:

MATRICES Y CEPAS EN LAS MUESTRAS NEGATIVAS PARA ESTUDIAR LA ESPECIFICIDAD (ESCASEZ DE FALSOS POSITIVOS)	
1-	0 ufc
2-	0 ufc
3-	7 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (50 µL tubo -4)
4-	7 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (50 µL tubo -4)
5-	8 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (52 µL tubo -4)
6-	8 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (52 µL tubo -4)
7-	8 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (62 µL tubo -3)
8-	8 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (62 µL tubo -3)
9-	35 ufc <i>C.sporogenes</i> (250 µL tubo -4)
10-	35 ufc <i>C.sporogenes</i> (250 µL tubo -4)
11-	32 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (208 µL tubo -4)
12-	32 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (208 µL tubo -4)
13-	32 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (248 µL tubo -3)
14-	32 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (248 µL tubo -3)
15-	64 ufc <i>Bacillus subtilis</i> (627 µL tubo -1)
16-	64 ufc <i>Bacillus subtilis</i> (627 µL tubo -1)
17-	64 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (438 µL tubo -4)

18-	64 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (438 µL tubo -4)
19-	63 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (450 µL tubo -4)
20-	63 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (450 µL tubo -4)

MATRICES Y CEPAS EN LAS MUESTRAS POSITIVAS DÉBILES PARA LÍMITE INFERIOR DE CUANTIFICACIÓN/LÍMITE DE DETECCIÓN	
1+	2 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (27 µL tubo -2)
2+	2 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (27 µL tubo -2)
3+	4 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (82 µL tubo -1)
4+	4 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (82 µL tubo -1)
5+	6 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (81 µL tubo -2)
6+	6 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (81 µL tubo -2)
7+	8 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (164 µL tubo -1)
8+	8 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (164 µL tubo -1)
9+	10 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (135 µL tubo -2)
10+	10 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (135 µL tubo -2)
11+	2 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (82 µL tubo -1) +2 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (130 µL tubo -3)
12+	2 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (82 µL tubo -1) +2 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (130 µL tubo -3)
13+	4 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (54 µL tubo -2) +4 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (31 µL tubo -3)
14+	4 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (54 µL tubo -2) +4 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (31 µL tubo -3)
15+	6 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (246 µL tubo -1) + 6 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (390 µL tubo -3)
16+	6 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (246 µL tubo -1) + 6 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (390 µL tubo -3)
17+	8 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (108 µL tubo -2) +8 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (61 µL tubo -3)
18+	8 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (108 µL tubo -2) +8 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (61 µL tubo -3)
19+	10 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (410 µL tubo -1) + 10 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (650 µL tubo -3)
20+	10 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (410 µL tubo -1) + 10 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (650 µL tubo -3)

MATRICES Y CEPAS EN LAS MUESTRAS POSITIVAS PARA ESTUDIAR LA SENSIBILIDAD (ESCASEZ DE FALSOS NEGATIVOS)	
1+++	16 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (532 µL tubo -2)
2+++	16 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (532 µL tubo -2)
3+++	16 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (532 µL tubo -2) +16 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (114 µL tubo -4) +16 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (104 µL tubo -2)
4+++	16 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (532 µL tubo -2) +16 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (114 µL tubo -4) +16 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (104 µL tubo -2)
5+++	16 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (532 µL tubo -2) + 16 ufc <i>Bacillus subtilis</i> (157 µL tubo -1) + 16 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (109 µL tubo -4)
6+++	16 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (532 µL tubo -2) + 16 ufc <i>Bacillus subtilis</i> (157 µL tubo -1) + 16 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (109 µL tubo -4)
7+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1)

8+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1)
9+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1) + 48 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (342 µL tubo -4)
10+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1) + 48 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (342 µL tubo -4)
11+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1) +48 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (312 µL tubo -2)
12+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1) +48 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (312 µL tubo -2)
13+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1) +48 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (327 µL tubo -4)
14+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1) +48 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (327 µL tubo -4)
15+++	96 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (320 µL tubo -1)
16+++	96 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (320 µL tubo -1)
17+++	96 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (320 µL tubo -1) + 96 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (684 µL tubo -4) + 96 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (624 µL tubo -2)
18+++	96 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (320 µL tubo -1) + 96 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (684 µL tubo -4) + 96 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (624 µL tubo -2)
19+++	96 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (320 µL tubo -1) + 96 ufc <i>Bacillus subtilis</i> (942 µL tubo -1) +96 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (654 µL tubo -4)
20+++	96 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (320 µL tubo -1) + 96 ufc <i>Bacillus subtilis</i> (942 µL tubo -1) +96 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (654 µL tubo -4)

- Controles negativos para verificar que los medios empleados están estériles: A una de las muestras no le añadimos ningún tipo de inóculo y será considerada como “muestra vacía”.
- Filtramos 100 mL de muestra por ensayo. La filtración se realiza con embudos de filtración estériles y filtros de membrana. Una vez filtrados los 100 mL de muestra, se podrían haber hecho pasar por el embudo 100 mL de caldo tioglicolato alternativo y filtrar también, como enjuague y revitalizador de las cepas anaerobias. Se retira el filtro con cuidado de no esperar ni un solo segundo a que sufra entrada de aire (lo que podría estresar y hacer inviables algunos microorganismos, sobre todo los anaerobios estrictos como son los *Clostridium*) y se coloca en la placa de cultivo adecuada de cada uno de los dos agares de placa (TSC y Cromokit-CP).
- Paralelamente se inoculan los triplicados de cada muestra en Quanti-P/A-CP y los cuadruplicados en Clostricult P/A.
- Todos se incuban juntos a $44,5 \pm 2,5$ °C durante 24 horas
- Transcurrido el tiempo de incubación se hace el conteo de las colonias sospechosas en cada una de las placas de cultivo, en el Quanti-P/A-CP y se observa el ennegrecimiento del agua en el Clostricult P/A.
- Si en el blanco salieran colonias típicas, descontaríamos su media (siempre que fuese baja, o tendríamos que repetir la validación). No ha sido así.

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 en alguno de los certificados por el proveedor para poder comparar): recuento real obtenido en los medios selectivos empleados (TSC y Cromokit-CP) para la cepa diana y las interferentes y acompañantes), SIN USAR NI EL MÉTODO DE ANÁLISIS NI LAS MUESTRAS, sembrando directamente las lentículas disueltas en Solución salina marina al 0,9%. Sembramos en superficie con ayuda de asas de Digrasky estériles en los dos medios de cultivo utilizados en esta validación, con duplicado de placas. El volumen de cepa inoculada en las placas

se calcula para encontrar un número razonable (dentro del rango medio de recuento) de colonias en las placas. El inóculo se realiza con micropipeta y puntas estériles.

Una vez incubadas las placas se realiza el recuento de colonias sospechosas en los dos 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.

Lectura de los negros:

		PLACAS DE NEGROS	
Medio, cepa y concentración teórica	Nº colonias obtenidas	%	ASPECTO de las colonias
TSC <i>Cl.perfringens</i> 7, 32 ufc	28	87,5 %	color crema-blanquecinas, con centro negro
TSC <i>Cl.perfringens</i> 7, 32 ufc	29	90,6 %	color crema-blanquecinas, con centro negro
TSC <i>Cl.perfringens</i> 174, 20 ufc	18	90,0 %	color crema-blanquecinas, con centro negro
TSC <i>Cl.perfringens</i> 174, 20 ufc	17	85,0 %	color crema-blanquecinas, con centro negro
Cromokit-CP <i>Cl.perfringens</i> 7, 32 ufc	35	109,4 %	color naranja, grandes
Cromokit-CP <i>Cl.perfringens</i> 7, 32 ufc	37	115,6 %	color naranja, grandes
Cromokit-CP <i>Cl.perfringens</i> 174, 20 ufc	22	110,0 %	color naranja, grandes
Cromokit-CP <i>Cl.perfringens</i> 174, 20 ufc	25	125,0 %	color naranja, grandes
TSC <i>Cl.sporogenes</i> 32 ufc	2	No procede	Crema, sin centro negro
TSC <i>S.typhimurium</i> 32 ufc	18		Incoloras, muy pequeñas
TSC <i>Proteus mirabilis</i> 32 ufc	0		-
TSC <i>Bacillus subtilis</i> 32 ufc	0		-
TSC <i>St.epidermidis</i> 32 ufc	0		-
Cromokit-CP <i>Cl.sporogenes</i> 32 ufc	0		-
Cromokit-CP <i>S.typhimurium</i> 32 ufc	0		-
Cromokit-CP <i>P. mirabilis</i> 32 ufc	0		-
Cromokit-CP <i>Bacillus subtilis</i> 32 ufc	0		-
Cromokit-CP <i>St.epidermidis</i> 32 ufc	0		-

Se demuestra la correcta estabilidad de las lenticulas diana empleadas, al mantenerse el log inicial, pero se podría aplicar un factor de corrección acorde al % de reducción/aumento calculado en la diana, porque las diana han bajado en TSC respecto al valor certificado y aumentan en el medio cromogénico. **No aplicamos el factor de corrección** porque en ningún caso significan variaciones de más del 50% de reducción ni más del 200% de aumento. Si fuese este recuento significativamente diferente (>/<50%) del valor certificado por el proveedor de cepas, se tomarían como base del estudio estos resultados, en lugar de los certificados por el proveedor (a no ser que extrañamente los resultados de la validación se acercasen más a los certificados por el proveedor que al de estos blancos positivos: no ha sido así). O según un criterio más estricto, si el valor obtenido estuviera fuera de la incertidumbre certificada, se invalidaría este trabajo y habríamos de repetirlo con otro lote de cepas; pero nos parece un criterio demasiado ortodoxo “químico” para trabajar bajo él en microbiología.

7. Resultados 24 horas a 44,5°C

MATRICES Y CEPAS EN LAS MUESTRAS NEGATIVAS PARA ESTUDIAR LA ESPECIFICIDAD (ESCASEZ DE FALSOS POSITIVOS)		TSC	CROMOKIT CP	QUANTI-P/A-CP	CLOSTRICULT
1-	0 ufc	0	0	0	-
2-	0 ufc	0	0	0	-
3-	7 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (50 µL tubo -4)	0	0	0	-
4-	7 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (50 µL tubo -4)	0	0	0	-
5-	8 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (52 µL tubo -4)	0	0	0	-
6-	8 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (52 µL tubo -4)	0	0	0	-
7-	8 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (62 µL tubo -3)	0	0	0	-
8-	8 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (62 µL tubo -3)	0	0	0	-
9-	35 ufc <i>C.sporogenes</i> (250 µL tubo -4)	0	0	0	-
10-	35 ufc <i>C.sporogenes</i> (250 µL tubo -4)	0	0	0	-
11-	32 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (208 µL tubo -4)	0	0	0	-
12-	32 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (208 µL tubo -4)	0	0	0	-
13-	32 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (248 µL tubo -3)	0	0	0	-
14-	32 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (248 µL tubo -3)	0	0	0	-
15-	64 ufc <i>Bacillus subtilis</i> (627 µL tubo -1)	0	0	0	-
16-	64 ufc <i>Bacillus subtilis</i> (627 µL tubo -1)	0	0	0	-
17-	64 ufc <i>Staph. epidermidis</i> (438 µL tubo -4)	0	0	0	-
18-	64 ufc <i>Staph. epidermidis</i> (438 µL tubo -4)	0	0	0	-
19-	63 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (450 µL tubo -4)	0	0	0	-
20-	63 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (450 µL tubo -4)	0	0	0	-

Ni un solo falso positivo en ninguno de los 4 métodos: Especificidad 100% en los 4 casos

MATRICES Y CEPAS EN LAS MUESTRAS POSITIVAS DÉBILES PARA LÍMITE INFERIOR DE CUANTIFICACIÓN/LÍMITE DE DETECCIÓN		TSC	CROMOKIT CP	QUANTI-P/A-CP	CLOSTRICULT
1+	2 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (27 µL tubo -2)	0	0	0	-
2+	2 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (27 µL tubo -2)	0	0	0	-
3+	4 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (82 µL tubo -1)	0	0	2	+
4+	4 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (82 µL tubo -1)	0	0	1	+
5+	6 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (81 µL tubo -2)	0	1	1	-
6+	6 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (81 µL tubo -2)	0	0	3	+
7+	8 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (164 µL tubo -1)	0	2	6	-
8+	8 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (164 µL tubo -1)	0	1	3	-
9+	10 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (135 µL tubo -2)	1	3	6	+
10+	10 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (135 µL tubo -2)	2	5	9	+
11+	2 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (82 µL tubo -1) +2 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (130 µL tubo -3)	0	0	0	+
12+	2 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (82 µL tubo -1) +2 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (130 µL tubo -3)	0	0	1	-
13+	4 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (54 µL tubo -2) +4 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (31 µL tubo -3)	0	0	8	+
14+	4 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (54 µL tubo -2) +4 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (31 µL tubo -3)	0	0	0	+
15+	6 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (246 µL tubo -1) + 6 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (390 µL tubo -3)	0	0	5	+
16+	6 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (246 µL tubo -1) + 6 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (390 µL tubo -3)	0	1	4	+
17+	8 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (108 µL tubo -2) +8 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (61 µL tubo -3)	0	1	4	-
18+	8 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (108 µL tubo -2) +8 ufc <i>Proteus mirabilis</i> (61 µL tubo -3)	1	1	5	+
19+	10 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (410 µL tubo -1) + 10 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (650 µL tubo -3)	1	4	9	+
20+	10 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 174 (410 µL tubo -1) + 10 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (650 µL tubo -3)	0	5	8	+

Se demuestra que el límite inferior de cuantificación/límite de detección es de >8-10 ufc/100 mL en TSC Agar, >6-8 ufc/100 mL en Cromokit-CP Agar, de >2-4 ufc/100 mL para Quanti-P/A-CP y de >2-4 ufc/100 mL para Clostricult. Como siempre, la filtración de membrana, se emplee después el agar que se emplee, reduce significativamente la capacidad de detección de *Clostridium perfringens*. Los negativos de valores más altos en Quanti-P/A-CP y Clostricult se deben sin duda a la incertidumbre microbiológica, según la cual aunque agitemos toda la mañana el inóculo, nunca habrá una distribución homogénea y puede haber inóculos de valor teórico 8 pero valor real 0, ya que si detectan inóculos de 2 y de 4, no es posible que no detecten otros de 6 u 8.

MATRICES Y CEPAS EN LAS MUESTRAS POSITIVAS PARA ESTUDIAR LA SENSIBILIDAD (ESCAZES DE FALSOS NEGATIVOS)		TSC	CROMOKIT CP	QUANTI-P/A-CP	CLOSTRICULT
1+++	16 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (532 µL tubo -2)	0	4	12	+
2+++	16 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (532 µL tubo -2)	1	5	15	+
3+++	16 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (532 µL tubo -2) +16 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (114 µL tubo -4) +16 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (104 µL tubo -2)	0	6	14	+
4+++	16 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (532 µL tubo -2) +16 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (114 µL tubo -4) +16 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (104 µL tubo -2)	1	0	18	+
5+++	16 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (532 µL tubo -2) + 16 ufc <i>Bacillus subtilis</i> (157 µL tubo -1) + 16 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (109 µL tubo -4)	0	5	17	+
6+++	16 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (532 µL tubo -2) + 16 ufc <i>Bacillus subtilis</i> (157 µL tubo -1) + 16 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (109 µL tubo -4)	0	7	15	-
7+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1)	6	49	53	+
8+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1)	4	45	55	+
9+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1) + 48 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (342 µL tubo -4)	5	46	56	+
10+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1) + 48 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (342 µL tubo -4)	6	43	53	+
11+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1) +48 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (312 µL tubo -2)	5	42	56	+
12+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1) +48 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (312 µL tubo -2)	4	48	57	+
13+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1) +48 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (327 µL tubo -4)	6	51	57	+
14+++	48 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (160 µL tubo -1) +48 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (327 µL tubo -4)	5	45	58	+
15+++	96 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (320 µL tubo -1)	8	89	102	+
16+++	96 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (320 µL tubo -1)	9	75	110	+
17+++	96 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (320 µL tubo -1) + 96 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (684 µL tubo -4) + 96 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (624 µL tubo -2)	9	83	107	+
18+++	96 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (320 µL tubo -1) + 96 ufc <i>Clostridium sporogenes</i> (684 µL tubo -4) + 96 ufc <i>Salmonella typhimurium</i> (624 µL tubo -2)	7	79	109	+
19+++	96 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (320 µL tubo -1) + 96 ufc <i>Bacillus subtilis</i> (942 µL tubo -1) +96 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (654 µL tubo -4)	8	80	112	+
20+++	96 ufc <i>Clostridium perfringens</i> 7 (320 µL tubo -1) + 96 ufc <i>Bacillus subtilis</i> (942 µL tubo -1) +96 ufc <i>Staphylococcus epidermidis</i> (654 µL tubo -4)	9	76	104	+

El método oficial (TSC Agar por filtración de membrana) resulta el peor, con 20% de falsos negativos y bajada de 1 log desde el recuento real. El Cromokit-CP Agar recupera mucho mejor, con 5% de falsos negativos y acercándose bastante en sus recuentos al valor inóculo, sobre todo en el rango medio. El Quanti-P/A se comporta magníficamente, sin un solo falso negativo y con valores

superiores a los certificados por siembra directa en TSC Agar (valor inóculo). El Clostricult obtiene un 5 % de falsos negativos.

En ningún caso han aparecido incontables, confluentes o valores extremos que haya que descartar por discrepantes. Tampoco hay valores discrepantes que descartar según el test de Grubs simple, aplicado desde internet.

Al comparar los resultados con los de los negros (que no pasan por filtración) se demuestra que lo que falla en el método oficial no es tanto el medio de cultivo sino sobre todo la filtración de membrana.

Al comparar los resultados de TSC en formato placa para filtración y en formato Quanti-P/A, se vuelve a demostrar que no falla el medio, en absoluto, sino que el fallo es radicalmente la filtración de membrana.

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.
- b) Dada la distribución contagiosa (denominada de Poisson) o heterogénea (denominada binomial negativa) que sufren los microorganismos en cualquier matriz, 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 perder el Norte con todos estos logaritmos.
- 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 sí 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.
- 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).

- 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); en DryPlates, a pesar de su menor tamaño, también se han podido contar adecuadamente entre esos dos márgenes. Los *Clostridium perfringens* forman colonias relativamente grandes, por lo que probablemente las placas con >100 ufc ya no se pueden contar adecuadamente, pero en Quanti-P/A si al haber mucha más superficie de recuento 20,7 x 13,9 cm (288 cm²) que en una placa de 90 mm (63,61 cm²), y muchísima más que en una plaquita de filtración de membrana de 55 mm (23,76 cm²).

- **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).
- **Precisión:** medida de dispersión de los resultados obtenidos respecto a su media. Medimos tanto la repetitividad (grado de concordancia entre resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando, realizadas en las mismas condiciones de medición: tiempo, operario, muestras, laboratorio) como 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.)
- **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
- **Selectividad inclusiva (inclusividad, sensibilidad cuantitativa):** escasez de falsos negativos empleando diferentes dianas
- **Especificidad exclusiva (exclusividad, especificidad cuantitativa):** 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 análisis químicos, no como células vivas que, por su naturaleza externa polisacárida, sufren distribuciones contagiosas en forma de microcolonias, clusters o biofilms).

Una vez se han leído las placas, se hará la media y desviación estándar para cada rango de medida. Los resultados obtenidos servirán para evaluar y validar si el método de recuento de *Clostridium perfringens* es adecuado o no con la ayuda de los resultados de exactitud y de precisión obtenidos, además de los otros parámetros más secundarios mencionados (linealidad, inclusividad, exclusividad, robustez, incertidumbre).

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. A pesar de que ya hemos mencionado de que no es lo mismo contar en los 288 cm² de unja bolsa Quanti-P/A que en los 23,76 cm² de una plaquita de filtración.

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

En cambio el límite inferior de cuantificación se debe considerar equivalente al límite de detección de los métodos cualitativos, ya que no existe forma de mejorarlo. Por ello, al dispararse la incertidumbre por debajo de 15 colonias/placa, en tales casos no se habla de recuentos sino de “valor estimado <15 ufc/100 ml”. Y también por ello un inóculo inferior a 15 ufc/100 mL puede dar lugar a falsos negativos incluso en un método cualitativo genial como el Clostricult P/A, si en realidad la incertidumbre en la homogeneización provoca que haya 0 ufc en esa muestra.

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 contra de los métodos de Filtración de Membrana y del Número Más Probable.

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

Resultados:

Se demuestra que el límite inferior de cuantificación/límite de detección es de >8-10 ufc/100 mL en TSC Agar, >6-8 ufc/100 mL en **Cromokit-CP Agar**, de >2-4 ufc/100 mL para **Quanti-P/A-CP** y de >2-4 ufc/100 mL para Clostricult. Como siempre, la filtración de membrana, se emplee después el agar que se emplee, reduce significativamente la capacidad de detección de *Clostridium perfringens*. Los negativos de valores más altos en Quanti-P/A-CP y Clostricult se deben sin duda a la incertidumbre microbiológica, según la cual aunque agitemos toda la mañana el inóculo, nunca habrá una distribución homogénea y puede haber inóculos de valor teórico 8 pero valor real 0, ya que si detectan inóculos de 2 y de 4, no es posible que no detecten otros de 6 u 8.

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 TSC Agar como medio clásico oficial, con el de Cromokit-CP Agar y con el de Quanti-P/A-CP). Aunque al disponer de cepas cuantitativas certificadas, a menudo confiamos más en el criterio de la recuperación relativa (a menudo no, al haber mermado las cepas en su transporte y almacenamiento).

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

▪ Exactitud (recuperación relativa respecto al valor inóculo de cepas)

Despreciaremos los valores cuyo duplicado en placa demuestra excesiva imprecisión

Estudiando la tabla de resultados de muestras positivas, los valores de exactitud o % de recuperación resultan:

TSC Agar placas: Las recuperaciones medias (lo más importante en una validación) son, **en el rango bajo, 2,1%, en el rango medio, 1,07 % y en el rango alto, 8,70%**, todas ellas muy por debajo del 50% de recuperación, que es el mínimo aceptable en medios selectivos. Por lo que el método oficial de filtración por membrana en TSC Agar quedaría invalidado.

Cromokit-CP Agar placas: Las recuperaciones medias (lo más importante en una validación) son, **en el rango bajo, 28,12 %, en el rango medio, 96,09 % y en el rango alto, 83,68 %**, dos de ellas superan el 50% de recuperación, que es el mínimo aceptable en medios selectivos.

Quanti-P/A-CP: Las recuperaciones medias (lo más importante en una validación) son, **en el rango bajo, 94,79 %, en el rango medio, 115,89 % y en el rango alto, 111,81%**, todas ellas superan el 50% de recuperación, que es el mínimo aceptable en medios selectivos, incluso dos de ellas superan el 100% del valor inóculo en medio TSC Agar en placa, lo que demuestra la excelencia del sistema Quanti-P/A.

Clostricult P/A: Al ser un método cualitativo, no de recuento, y al pedir la legislación “0 ufc/100 mL”, asignamos a los valores de ausencia 0 y a los de presencia >0. Por tanto, en el rango bajo obtendríamos un 83,33 % de “exactitud relativa”, en el medio 100% y en el alto 100%. Todas ellas superan el 50% de recuperación, que es el mínimo aceptable en medios selectivos.

Toda exactitud relativa de un medio selectivo que supere el 50% del valor inóculo, se debe considerar adecuada, comparando con los valores de productividad de los medios según la Norma ISO 11133; por

tanto podemos considerar muy adecuada la recuperación relativa conseguida en los rangos medio y alto del Cromokit-CP Agar y en los tres rangos del Quanti-P/A-CP, pero no del TSC Agar.

Tabla de recuperación absoluta Cromokit-CP Agar placas por filtración respecto a TSC Agar placas por filtración:

Rango de Medida	Exactitud medida como recuperación absoluta Cromokit-CP Agar / TSC Agar	Exactitud medida como recuperación absoluta colonias Cromokit-CP Agar / colonias TSC Agar
16 ufc/100mL	28,12 % / 2,1 % = 1.339,05 %	27 / 2 = 1.350 %
48 ufc/100mL	96,09 % / 1,07 % = 8.980,37 %	369 / 41 = 900 %
96 ufc/100mL	83,68 % / 8,70% = 961,84 %	482 / 50 = 964 %
Exactitud media	3.760,09 %	1.071,33 %

El Cromokit-P/A Agar en placa por filtración recupera entre 10 y 37 veces más que el TSC Agar en placa por filtración.

Tabla de recuperación absoluta Quanti P/A-CP respecto a TSC Agar placas por filtración:

Rango de Medida	Exactitud medida como recuperación absoluta Quanti-P/A-CP / TSC Agar	Exactitud medida como recuperación absoluta colonias Quanti-P/A-CP / colonias TSC Agar
16 ufc/100mls	94,79 % / 2,1 % = 4.513,81 %	91 / 2 = 4.550,00 %
48 ufc/100mls	115,89 % / 1,07 % = 10.830,84 %	445 / 41 = 1.085,37 %
96 ufc/100mls	111,81 % / 8,70 % = 1.285,17 %	644 / 50 = 1.288,00 %
Exactitud media	5.543,27 %	2.307,79 %

El TSC en Quanti-P/A-CP recupera entre 23 y 55 veces más que al TSC en placa por filtración.

Concluimos ante ambas formas de medir la exactitud (relativa y absoluta), que el medio que mejor se comporta ha sido el TSC Agar en formato Quanti-P/A-CP, seguido por el Cromokit-CP Agar en placa, superando ambos medios la exactitud del método oficial TSC Agar en placas, que se comporta muy mal.

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 3-5 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 en cada uno de los medios/métodos, ya que no hemos hecho duplicados de placas, pero en otros casos también habremos de 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 aun 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 parámetros que intervienen en la medida y hemos sabido detectar. 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 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. 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

En este caso tenemos en cuenta las réplicas de muestras idénticas, pero en otros casos también habremos de tener en cuenta las otras formas de medir la precisión, enumeradas al comienzo de este capítulo 8.3.

▪ Precisión en TSC Agar placa

Rango de Medida	Rtos. medios $X_1 - X_{30}$	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
16 ufc/100mls	$X_2 - X_{10}$: 0,33	0,47	$0,47 / 0,33 = 142,42 \%$
48 ufc/100mls	$X_{12} - X_{20}$: 5,125	0,78	$0,78 / 5,125 = 15,23 \%$
96 ufc/100mls	$X_{22} - X_{30}$: 8,33	0,745	$0,745 / 8,33 = 8,95 \%$

▪ Precisión en Cromokit-CP placa

Rango de Medida	Rtos. medios $X_1 - X_{30}$	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
16 ufc/100mls	$X_2 - X_{10}$: 4,5	2,22	$2,22 / 4,5 = 49,27 \%$
48 ufc/100mls	$X_{12} - X_{20}$: 45,125	2,85	$2,85 / 45,125 = 6,31 \%$
96 ufc/100mls	$X_{22} - X_{30}$: 80,33	4,68	$4,68 / 80,33 = 5,82 \%$

▪ Precisión en Quanti-P/A-CP

Rango de Medida	Rtos. medios $X_1 - X_{30}$	Desviación estándar Sm	Precisión CV (Sm/Rto. medio) %
16 ufc/100mls	$X_2 - X_{10}$: 15,17	1,95	$1,95 / 15,17 = 12,86 \%$
48 ufc/100mls	$X_{12} - X_{20}$: 55,625	1,73	$1,73 / 55,625 = 3,11 \%$
96 ufc/100mls	$X_{22} - X_{30}$: 107,33	3,45	$3,45 / 107,33 = 3,21 \%$

▪ Comentarios

La menor precisión (mayor CV %) se ha dado en todos los medios en el rango de recuento más bajo, como es habitual. El mejor valor de precisión lo obtiene los rangos medio y alto de **Quanti-P/A-CP**, seguido de los rangos medio y alto de **Cromokit-CP Agar** en placa. En todos los casos la precisión, siempre < 70 %, es adecuada, incluso al ser < 50%, es buena; en **Quanti-P/A-CP**, siempre < 25%, es excelente.

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 otros fabricantes de cepas cuantitativas. CV% inferiores al 25% se suelen considerar excelentes por los estándares más estrictos (los cuales sólo cumpliría el Quanti-P/A en sus tres rangos). De modo que en prácticamente todos los rangos y todos los medios la precisión CV% ha resultado más que excelente.

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.

- Precisión de los duplicados (repetitividad) (media en CV%):

TSC	CROMOKIT CP	QUANTI-P/A-CP	CLOSTRICULT
0	4	12	+
1 0,5/0,5 = 100 %	5 0,5/4,5 = 11,11 %	15 1,5/13,5 = 11,11 %	+ 0 %
0	6	14	+
1 0,5/0,5 = 100 %	0 3/3 = 100%	18 2/16 = 12,5 %	+ 0 %
0	5	17	+
0 0/0 = indet	7 1/6 = 16,67 %	15 1/16 = 6,25 %	- 100 %
6	49	53	+
4 1/5 = 20 %	45 2/47 = 4,26 %	55 1/54 = 1,85 %	+ 0 %
5	46	56	+
6 0,5/5,5 = 9,09 %	43 1,5/44,5 = 3,37 %	53 1,5/54,5 = 2,75 %	+ 0 %
5	42	56	+
4 0,5/4,5 = 11,11 %	48 3/45 = 6,67 %	57 0,5/56,5 = 0,88 %	+ 0 %
6	51	57	+
5 0,5/5,5 = 9,09 %	45 3/48 = 6,25 %	58 0,5/57,5 = 0,87 %	+ 0 %
8	89	102	+
9 0,5/8,5 = 5,88 %	75 7/82 = 8,54 %	110 4/106 = 3,77 %	+ 0 %
9	83	107	+
7 1/8 = 12,5 %	79 2/81 = 2,47%	109 1/108 = 0,93 %	+ 0 %
8	80	112	+
9 0,5/8,5 = 5,88 %	76 2/78 = 2,56 %	104 4/108 = 3,70 %	+ 0 %
MEDIA 30,39 %	MEDIA 16,19%	MEDIA 4,46 %	MEDIA 10 %

La repetitividad es mucho mejor en **Quanti-P/A-CP**, es un método muy repetitivo, seguida de **Cromokit-CP**. El menos repetitivo es el TSC Agar en placa por filtración, aunque supera el estándar del 50% de CV%.

No hemos trabajado la reproducibilidad entre diferentes laboratorios, analistas o días.

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:



Resultados

En nuestro caso la linealidad queda demostrada cuando las medias obtenidas se acercan evidentemente a los valores inóculo, en cada uno de los tres rangos.

En TSC Agar en placa:

Rango de Medida	Rtos. medios X_1 - X_{30}
16 ufc/100mL	0,33 colonias/placa
48 ufc/100mL (triple que en rango bajo)	5,125 colonias/placa (sube respecto al rango bajo, pero mucho más de x3)
96 ufc/100mL (doble que en rango medio)	8,33 colonias/placa (sube respecto al rango medio, aunque sólo un 20% por debajo de x2)

La linealidad en TSC Agar por filtración es muy mala en los tres rangos

En Cromokit-CP Agar en placa:

Rango de Medida	Rtos. medios X_1 - X_{30}
16 ufc/100mL	4,5 colonias/placa
48 ufc/100mL (triple que en rango bajo)	45,125 colonias/placa (sube respecto al rango bajo, pero x10, mucho más de x3)
96 ufc/100mL (doble que en rango medio)	80,33 colonias/placa (sube respecto al rango medio, aunque sólo un 11% por debajo de x2)

La linealidad en Cromokit-CP Agar por filtración es bastante buena, excepto en el rango bajo

En Quanti-P/A-CP:

Rango de Medida	Rtos. medios X_1 - X_{30}
16 ufc/100mL	15,17 colonias/placa
48 ufc/100mL (triple que en rango bajo)	55,625 colonias/placa (aprox triple que en rango bajo)
96 ufc/100mL (doble que en rango medio)	107,33 colonias/placa (aprox doble que en rango medio)

La linealidad en Quanti-P/A-CP es excelente

8.5 Selectividad inclusiva: escasez de falsos negativos con diferentes dianas.

En placas de TSC Agar ha habido un 20% de falsos negativos (recuentos 0), lo cual lo invalidaría aunque sea el método oficial, al obtener una inclusividad inferior al 95%, en concreto del 80%

En placas de Cromokit-CP Agar ha habido un 5% de falsos negativos (recuentos 0), por lo que la inclusividad es del 95%, aceptable

E, Quanti-P/A-CP ha habido un 0% de falsos negativos (recuentos 0), por lo que la inclusividad es del 100%, magnífica

En Clostricult P/A ha habido un 5% de falsos negativos (no viraje a negro), por lo que la inclusividad es del 95%, aceptable

8.6 Especificidad exclusiva: escasez de falsos positivos con diferentes interferentes. No observamos diferencias entre los diferentes interferentes/acompañantes, que en el 100% de los casos han sido correctamente descartados cuando estaban presentes sin las dianas en cualquier rango. Se demuestra así la especificidad exclusiva del 100% para los 4 métodos.

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

El Cromokit-CP Agar en placa por filtración recupera 10 veces más colonias que el TSC Agar en placa por filtración, de modo que no puede hablarse de robustez paramétrica

En Quanti-P/A-CP recupera 23 veces más colonias que el TSC Agar en placa, y por tanto 2,3 veces más colonias que el Cromokit-CP Agar en placa por filtración; de nuevo no podemos hablar del recuento de *Clostridium perfringens* como un parámetro robusto, máxime si recordamos los resultados del obsoleto Agar m-CP que fue oficial durante 15 años y obtenía recuentos incluso 10 veces por debajo que el TSC Agar.

Independientemente de ello, sabemos por los intercomparativos en los que participamos, que el parámetro *Clostridium perfringens* es el menos robusto de cuantos trabajamos, dado que sea cual sea el laboratorio, operario o método que se emplee, los resultados nunca son similares entre todos los participantes.

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, si aplicamos 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 a tan sesgada fórmula.

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.

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

Vistos todos los valores paramétricos calculados, se debería invalidar oficialmente el método de filtración de membrana para *Clostridium perfringens*, porque el cambio de mCP Agar a TSC Agar sólo ha mejorado ligeramente los dramáticos resultados de los años 2003-2017 en que el primero era el obligado, pero no lo suficiente. El uso de filtración con agar cromogénico Cromokit-CP Agar mejora mucho más los resultados, hasta el punto de quedar validado, sobre todo en los rangos medio y alto de recuento. Pero lo que realmente funciona extraordinariamente bien en todos los rangos y todos los parámetros estadísticos es el método de recuento sin filtración, la patente de MICROKIT Quanti-P/A-CP.

Dada la disyuntiva entre lo legislado (ej: 0 ufc/100 mL) y lo que los laboratorios podemos demostrar estadísticamente en cuanto al límite inferior de cuantificación, a causa de la distribución contagiosa de Poisson que siguen los microorganismos en las muestras naturales (por mucho que agitemos 100 ufc en 100 ml, nunca conseguiremos que haya 1 ufc/ml) y dado que por debajo de 15col/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*) en vez de indicar “AUSENTE” o “0 ufc/100 mL” y si así se nos exigiese, pondremos: “recuento *estimado* < 15 col/placa”.

Por todo ello, se considera validado el parámetro de recuento de *Clostridium perfringens* en nuestras muestras y con los 2 métodos alternativos de recuento ensayados (Cromokit-CP Agar y Quanti-P/A-CP) de modo que podemos usar cualquiera de ellos a nuestra conveniencia. También podemos emplear el método Clostricult P/A, tanto para screening negativo de muestras, como para confirmar muestras presuntamente positivas que obtengamos con los otros métodos. Seguiremos empleando el método oficial con filtración de membrana en TSC Agar porque así nos exigen las autoridades, pero hemos demostrado que es un método muy poco fiable. Parece que la peor opción es la oficial, al suponer más trabajo, y peores resultados en todos los parámetros estadísticos analizados..

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

Se considerará caducada la presente validación, y por ello habrá que repetirla, en el plazo de 5 años, o bien antes cuando haya 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, cambios de equipos relevantes, cambios de tipo de membranas filtrantes, cambio de tipos de muestras, cambio del procedimiento...

10. Bibliografía

- *Guía para la validación de ensayos microbiológicos y ejemplos de protocolos*. MICROKIT, © 2014
- Informe-tipo de validaciones microbiológicas cuantitativas MICROKIT © 2014
- UNE-EN-ISO 14189:2013, Detección y recuento de *Clostridium perfringens* en aguas.
- Validación de análisis de aguas. 11 pp. MICROKIT © 09-Julio-2009

11. ANEXOS

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

12. Personas que han intervenido en la validación, cargos, fechas y Firmas:



Jorge Sanchis Solera

Responsable de validación de MICROKIT

Anónimo

Responsable del laboratorio de microbiología ETAP

6 de Noviembre de 2018.

ANEXO 1

Estudio de las Posibles causas de aparición de resultados anómalos

- Bajada del valor certificado de todas las cepas con respecto a los negros, lo cual, no llegando a ser el bajón inaceptable de 1 log de otras cepas cuantitativas, si dificulta los cálculos adecuados

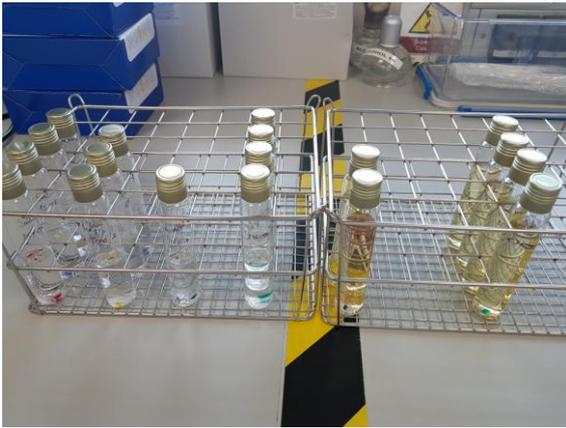
ANEXO 2

Propuestas de mejora para próximas validaciones

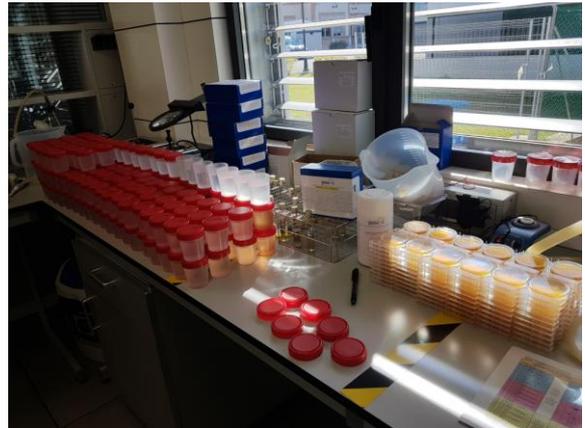
- La próxima vez llevar las cepas cuantitativas en mano, sin que pasen por almacenes de transportistas, distribuidores, congeladores del laboratorio...
- Hacer no sólo 2 negros en medio general, y en los medios alternativos, sino mínimo 3 en cada medio y a ser posible 5 con distintas lenticulas diana del mismo lote, ya que los resultados, si hubiera habido que aplicar los factores de corrección por bajada de concentración de la cepa respecto al certificado, se hubieran tenido que calcular a partir de una sola placa de cada medio selectivo, lo cual dispara la incertidumbre sobre la cifra del auténtico valor inóculo. Aún así la validación queda salvada gracias a la exactitud absoluta calculada entre los 3 métodos.
- En próximas validaciones incluir valores de recuento muy altos, para que si las dianas bajan significativamente, al menos se puedan tener esos resultados

ANEXO 3

Fotografías de la validación



Disolución de las cepas y diluciones decimales



20 muestras con 4 métodos



Filtración de las muestras para Placas



Placas de ambos medios de filtración:
TSC y Cromokit-CP



Quanti-P/A-CP



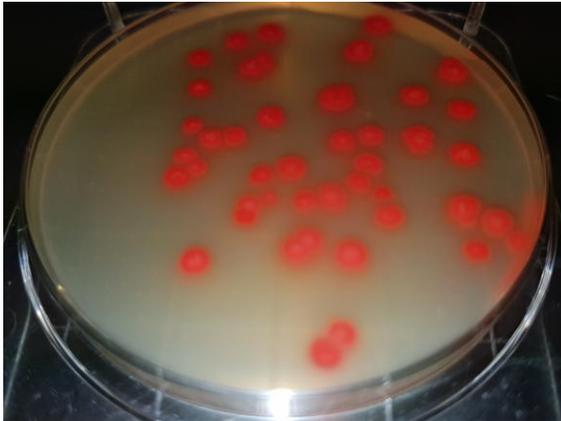
Incubación de las placas y de Clostricult P/A



Incubación de las placas y de los Quanti-P/A-CP



Aspecto de las placas TSC filtradas tras incubar



Aspecto de las placas Cromokit-CP Agar tras incubar los negros de *Clostridium perfringens*



Aspecto de los Quanti-P/A-CP tras incubar

ANEXO 4

Certificados de calidad de los productos y cepas empleados