

INFORME DE VALIDACIÓN CUANTITATIVA
RECuento DE *AEROBIOS* EN LABORATORIO COSMÉTICO
MÉTODO RÁPIDO PCA-CROMOGÉNICO (MAXIM RAPID AGAR) FRENTE AL
MÉTODO CLÁSICO TSA

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: fotografías de la validación y certificados de análisis de las herramientas empleadas

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

1. Objetivos

Comprobar si el método de recuento de *Aerobios* a 20-25°C propuesto con PCA/TSA-cromogénico MICROKIT (Ref. deshidratado BCD510, Placas preparadas ECOP27) iguala o mejora la rapidez de obtención de resultados respecto al método utilizado estándar empleado hasta ahora en nuestro laboratorio de análisis microbiológicos de productos cosméticos (TSA), tal y como sabemos lo hace fulminantemente con los aerobios a 30-37°C, por anteriores validaciones. Y verificar si los detecta y enumera adecuadamente en las muestras procesadas. Es decir, comprobar que la técnica propuesta frente a la utilizada, los medios de cultivo utilizados y los analistas que intervienen en el control rutinario de recuento de *Aerobios*, son idóneos, con resultados aptos y fiables, determinados mediante la exactitud y la precisión de nuestro método en los rangos de trabajo habituales.

Si el medio PCA/TSA cromogénico a 20-25°C es más rápido que el TSA clásico a 5 días con recuentos significativamente similares y además, en la futura validación del recuento de hongos, el medio propuesto RapidYM Agar, también de Microkit, es más rápido que los estándar (Sabouraud Dextrose Agar ó Sabouraud Caf Agar) a 5 días, con recuentos significativamente similares, podremos ahorrar tiempo en la liberación de nuestros lotes, ya que los demás parámetros tardan entre 3 y 4 días.

2. Alcance

Las muestras de cosméticos fabricadas en nuestra empresa y/o procesadas en nuestro laboratorio.

3. Parámetro microbiológico a validar

El parámetro objeto de la presente validación es el recuento de bacterias *Aerobias mesófilas* a 20-25°C durante 2-5 días. Lo aerobios a 25°C son el indicador de la microbiota alterativa cuando el producto se va a almacenar a temperatura ambiente (primavera-otoño en países templados como España, incluso verano en países de latitudes altas). En cambio los aerobios a 30-35°C son un indicador de la microbiota asociada al hombre, algo redundante cuando además ya estamos buscando activamente los patógenos tras enriquecimiento neutralizante. Y ya sabemos que el PCA cromogénico de Microkit es capaz de dar resultados de alerta fulminantes a 30-35°C en sólo 18-24h. Nos faltaba validar lo que ocurre con este medio cuando se incubaba a 20-25°C para detectar y enumerar los aerobios alterativos “de almacenamiento”, no asociados al hombre sino al medio ambiente y al deterioro del producto.

4. Diseño del experimento

Analizaremos con el método habitual empleado en este laboratorio (TSA), basado en la Norma ISO 21149, duplicado con el método rápido de 35°C (placas de PCA/TSA cromogénico), un número de muestras suficiente que, previamente, habremos contaminado con cantidades conocidas muy precisas de microorganismos diana, interferentes y acompañantes (aunque en un recuento total de aerobios todas ellas se consideran diana). Así podremos comparar los resultados finales obtenidos con los resultados esperables (comparación doble, al emplear a la vez cepas cuantitativas y métodos duplicados) y aplicar las técnicas estadísticas adecuadas, lo más inteligibles posible, para evaluar el nivel de efectividad. Éste se podrá calcular mediante los parámetros estándar de validación cuantitativa (exactitud y precisión a diferentes rangos de recuento en placa). De este modo podremos tomar la decisión según el método quede o no quede validado en nuestro laboratorio (la exactitud y la precisión a diferentes rangos cumplan con los estándares internacionales de aceptabilidad). Y todo ello con los tipos de muestras que analizamos

habitualmente, con nuestros equipos, con nuestros medios de cultivo, en nuestras instalaciones, mediante nuestros analistas... con una demostración basada en el método científico y en pruebas documentales.

El número de muestras elegido para esta validación se podría haber calculado 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 al ser éstas menos de 1000, un número de 10 sería el adecuado. Sin embargo, al parecer nos muy pocas, nos acercaremos al criterio menos extendido de elegir la raíz cuadrada del número de muestras, de modo que de 1000 muestras analizadas al año, la raíz cuadrada serían 32, redondeando a 30 (10 para cada uno de los tres rangos de recuento en placa). Realizaremos pues el análisis de validación en 30 muestras (en cada uno de los 3 rangos de recuento en placa), todo ello sin contar con la duplicidad de los métodos comparados, que nos aportará datos para la precisión. Así como blancos de muestras sin cepas (para conocer la contaminación inicial de las muestras más problemáticas y en caso positivo, descontar dicho recuento del obtenido para poder compararlo con el inoculado). Y un "negro" de cada una de las cepas sin muestra (y sin seguir los pasos el análisis) directamente añadidas al caldo diluyente (por si no creciesen en el experimento verificar que no ha sido un problema de las cepas sino un excesivo poder inhibitorio de las muestras); estos negros se realizarán en todos los medios empleados, 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). Los negros se harán preferentemente en el rango medio de recuento en placa, al ser el que menos imprecisión tiene.

En cuanto a la naturaleza de las muestras, existen dos criterios enfrentados: Según unos autores deben hacerse muestras que representen todos los tipos cosméticos que fabricamos y/o analizamos (excepto aquéllos de demostrada capacidad inhibitoria intrínseca donde inocular cepas no sirve para nada porque luego no son capaces de crecer), a fin de tener una muestra más representativa de todo lo que fabricamos/analizamos. Según otros autores, debemos elegir sólo los tipos de matrices que más problemas microbiológicos nos hayan dado históricamente, porque si no los buenos resultados de las otras enmascararían los resultados más críticos. Como ambas posturas nos parecen igualmente razonables (ya que si elegimos sólo la segunda no vamos a saber mediante la validación si, cuando en nuestros análisis rutinarios no obtenemos crecimientos, se debe a que no hay microorganismos, o se debe a que nuestros conservantes inhiben tan bien que nuestro método no es capaz de detectar adecuadamente aunque los microorganismos estén presentes), decidimos hacer conjuntamente muestras representativas de todos los cosméticos que fabricamos/analizamos y muestras de las matrices que más problemas microbiológicos nos han dado históricamente en otros lotes (o si no hubiera, de las que conocemos como más inhibitorias). Si no encontrásemos 30 tipos diferentes de cosméticos, repetiríamos alguno de diferentes lotes.

Somos conscientes de que en vez de con placas duplicadas es mejor trabajar con placas triplicadas, pero consideramos suficiente en esta validación haber hecho placas duplicadas porque en realidad, al usar tres rangos de recuento en placa, tenemos datos repetitivos sobrados para estimar la precisión. De modo que el total de placas empleadas en la validación será de 30 muestras x 3 rangos x duplicado x 2 medios = 360 placas. Así, el número de datos finales será muy alto, lo que nos permitirá después aplicar una estadística más simple y comprensible para todos.

Leeremos los recuentos a las 48 h en ambos medios y también a las 72h en el método rápido y a los 5 días en TSA.

Además aprovechamos para intentar comprobar si algunas de nuestras muestras tienen un elevado poder inhibitorio intrínseco (“efecto matriz”), realizando el recuento, en paralelo a la solución madre (dilución -1 de 10 g de muestra en un frasco con 90 mL del LPT Neutralizing Broth), también en la dilución -2 (1 mL del frasco a un tubo con 9 mL del LPT Neutralizing Broth).

Previamente habremos inoculado en nuestras propias matrices (10 g en 90 mL de LPT Neutralizing Broth), 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 (ufc/0,1 mL del frasco de 100 mL), 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 del microorganismo diana; aunque en recuento de aerobios todas son diana. Si además queremos conocer la inclusividad del método, habremos de emplear varias cepas diana diferentes y si queremos conocer la exclusividad del método, habremos de usar varias cepas no-diana (que no existen en recuentos de aerobios). En el caso concreto de recuento de aerobios, elegiremos los aerobios más dispares: dos Gram positivos (por ejemplo *Staphylococcus hominis* y *Enterococcus faecalis*), un Gram negativo oxidasa positivo (*Pseudomonas aeruginosa*) y un Gram negativo oxidasa negativo (*E.coli*). Y no sólo cepas de colección, también cepas nativas o salvajes de la zona geográfica donde se realice la validación: El *Staphylococcus hominis* lo es, bacteria del mal olor de los pies.

En validaciones cuantitativas de cosméticos y medicamentos, debe tenerse en cuenta que (*a diferencia de las cualitativas, en las cuales enriquecemos la muestra con el inóculo*) hemos de inocular, en el rango bajo, hasta 15 ufc/placa (en el medio 16-50 y en el alto hasta 200), es decir, si inoculamos 0,1 ml por placa en siembra en superficie, serían hasta 15 ufc/0,1ml de “muestra diluida de 100 ml”; por ello en los 100 ml de muestra diluida, en realidad habremos de inocular 1.000 veces más: hasta 15.000 ufc. Y lo mismo para los rangos medio y alto. Y muy probablemente varias lenticulas (cada una en tubo de salina de 10 ml) para el experimento total. Las ufc inoculadas en una misma muestra deben ser la suma de las diversas diana elegidas (por ejemplo si son 2dianas, 12 ufc/placa de cada una de ellas serán 24 ufc/placa).

Los negros de cepas sin muestra, para comprobar la concentración real de las cepas en el momento de usarlas, es más fácil que den resultados más cercanos al del certificado, ya que no pasan por el cosmético.

En Validaciones cuantitativas de aerobios 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 4 cepas en 4 muestras y luego repetirlas una por una en las demás muestras).

No olvidar hacer blancos sin cepas de algunas muestras al azar, para confirmar que las muestras estaban correctas.

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 placa (aprox. <15, 16-50 y 51-200 ufc). Si los microorganismos

diana formasen colonias muy pequeñas (ej: Enterococos) el rango máximo podría subir; si formasen colonias muy grandes (ej. *Pseudomonas aeruginosa*) el rango alto podría bajar (en general, se acepta que como máximo la superficie de las colonias sume 1/3 de la superficie de la placa).

Para dichos cálculos se puede aplicar la fórmula lógica $V_{\text{cepa}} \times [\text{cepa}] = V_{\text{necesario}} \times [\text{final necesaria}]$, 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. Es mejor llevar los cálculos ya hechos al día de la validación, como se ha hecho.

O bien la regla de tres simple para ver cuántos μl de inóculo necesitaremos por cada muestra. Y además, cuantos ml de inóculo necesitaremos para el total de muestras. Por ejemplo, si tenemos *E.coli* 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, de la que necesitamos inocular en cada muestra positiva 1 ml (1.840 ufc/muestra de 10 g en 100 ml de disolvente, para obtener 184 ufc/g (18 ufc/ml), que al sembrar 1 ml de esto en placa permitirán obtener aproximadamente 18 colonias/placa). En el ejemplo, si vamos a necesitar, en una cepa concreta, inocular 1 ml de esta dilución -2 (o bien 0,1 ml de la dilución -1) en 7 de las 30 muestras de cada uno de los 2 métodos, necesitaremos 34 ml (o bien 3,4 ml de la dilución -1) es decir, al menos 4 tubos Ringer 10 ml de la dilución -2 de esta dilución, y sólo para este rango. Sumando los demás rangos (por ejemplo, 0,2 ml de la -1 para obtener 36 colonias/placa, en otras 4 de las 20 muestras; y 0,4 ml de la -1 para obtener 72 colonias/placa en otras 4 de las 20 muestras; y 0,8 ml de la -1 para obtener 144 colonias/placa en otras 4 de las 20 placas; las otras placas irán sin diana (blancos) para control de la especificidad exclusiva) obtendremos la cantidad de inóculo (nº de tubos Ringer) que necesitaremos para cada uno de los 2 métodos (multiplicar por 2 la cantidad obtenida). Y así con todas las cepas diana, interferentes y acompañantes.

Se ha de tener en cuenta que el volumen final inoculado de cada dilución de cepa sea suficiente para inocular todas las muestras y el negro de cepas sin muestra (así como recordar que la muestra de 100 ml en la que están los 10 g de muestra -muestra tratada-, diluyen en 2 logaritmos la concentración que añadamos por placa de 1 ml por muestra, o por 3log si añadimos 0,1 mL/placa) y para ello habrá cepas de las que por tener concentración inicial alta necesitaremos poco volumen y otras que por tener concentración inicial más baja podría necesitarse el lote completo de dicha cepa. Como inocularemos en tres rangos, es más fácil calcular la concentración del inóculo para obtener el rango bajo (ej. 10 ufc/ml final de muestra tratada = 10 colonias/placa) y añadirlo a las muestras, extraer de éstas el volumen necesario para las placas y después añadir el doble de inóculo a cada muestra para conseguir el rango medio (en el ej. $10 + 20 = 30$ ufc/ml final de muestra tratada = 30 colonias/placa), extraer de éstas el volumen necesario para las placas y después añadir un tercer inóculo del doble del inicial a cada muestra para conseguir el rango alto (en el ej. $30 + 30 = 60$ ufc/ml final de muestra tratada = 60 colonias/placa). Por ello estos cálculos y su revisión requieren la mayor concentración y bastante tiempo.

Aunque en los análisis normales se hicieran varias diluciones, carece de sentido hacerlo en una validación cuantitativa, ya que si calculamos el inóculo necesario para obtener el nº de colonias/placa de por ejemplo <15, 16-50 y 51-200 en la dilución madre, ya en la segunda dilución los recuentos quedarían por debajo de las 15 colonias/placa que definen el mínimo recuento fiable. Por ello lo haremos sólo en la dilución madre, que es la que más puede interferir en los crecimientos y lecturas de placas (recordando el concepto de hacer siempre la validación en el peor de los casos). Y si lo hacemos es para demostrar si alguna muestra tiene excesivo poder inhibitorio intrínseco y, por lo tanto, los recuentos son mayores a la dilución mayor, en vez de lo que sería simple lógica matemática.

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. Como esta validación es de recuento de aerobios, no aplica esta precaución.

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 todos los acompañantes) y en otras sólo uno de los acompañantes (y todos los interferentes). Como esta validación es de recuento de aerobios, tampoco aplica esta precaución.

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 también la comparada entre los diversos medios de recuento.

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.

Si se desea realizar estudio de la **reproducibilidad**, deben inocularse y analizarse la mitad de las muestras (10 de cada 20) un día y las 10 restantes, que deben ser idénticas a las 10 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. Dado que el laboratorio participa en ensayos intercomparativos, ya tiene datos de su reproducibilidad, por lo que podemos olvidar esta componente de la precisión en esta validación.

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 al menos dos interferentes diferentes en el segundo, (además de dos cepas acompañantes). *[En el caso de aerobios no procede estudiar la exclusividad: 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 muchas premisas o componentes de la incertidumbre microbiológica que no se están teniendo en cuenta en dichos estándares. Por ello, consideramos absurdo calcular una incertidumbre exclusivamente basada en datos de precisión, como se hace en las validaciones químicas.

El experimento se inicia el día 7 de Febrero de 2023, los resultados se leen el 9, 10 y 13, el informe se acaba de redactar por parte de la empresa asesora MICROKIT, en su servicio del curso de validación, el día 15 de Febrero de 2023.

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:

- Micropipeta rango 100 - 1000µL
- Micropipeta rango 10 - 100µL
- Puntas para micropipeta
- Agitador Vórtex
- Autoclave
- Estufa a 22,5 °C ± 2,5°C
- Nevera y su congelador
- Probetas estériles
- Botes de 100 ml estériles
- Alcohol de 70°
- Cabina de flujo laminar
- Placas de 90 mm estériles
- Balanza

5.2 Medios y diluentes utilizados

Medios y kits MICROKIT	Lote y caducidad
Agua marina al 0,9% solución isotónica 10 ml para disolver cepas	2209/3950 6, 28-09-2024
Agua marina al 0,9% sol.isotónica 9 ml para diluciones de cepas	2211/3972 6, 28-11-2024
LPT Neutralizing Broth en frascos 90 mL para neutralizar 10 g de muestra	2211/3973 6, 15-12-2024
LPT Neutralizing Broth en tubos 9 mL para la dilución [-2]	2211/3972 6, 25-11-2024
TSA deshidratado como medio de referencia	21759, 09-01-2024
PCA/TSA Cromogénico (=Maxim Rapid Agar) en placa de 22-25 mL (para abreviar, PCA-cromogénico o Cromokit-.PCA)	2212/3981 6, 03-04-2023

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. Y, si es posible, cepas nativas (salvajes, “in house”) además de las de colección, para aumentar el rigor de la validación. Se eligen siempre 2 cepas diana, 2 interferentes y 2 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:

Ref. universal	Cepa	CONCENTRACIÓN MEDIA	PRECISIÓN DEL LOTE	LOTE/CADUCIDAD
WDCM00025	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$(2,5 \pm 0,8) \times 10^7$ en TSA	17,34% en TSA	07-10-23
WDCM00090	<i>Escherichia coli</i>	$(1,22 \pm 0,48) \times 10^4$ en TSA	21,62% en TSA	07-10-23
WDCM00087	<i>Enterococcus faecalis</i>	$(3,20 \pm 0,70) \times 10^4$ en TSA	11,52% en TSA	07-10-23
PECJIT	<i>Staphylococcus hominis</i> salvaje de piel humana, identificado genéticamente ante Genbank	$(7,54 \pm 1,44) \times 10^7$ en TSA	12,40% en TSA	07-04-24

¿Por qué hemos elegido estas cepas como dianas, ~~interferentes y acompañantes~~ y cómo crecen en los medios empleados?:

Pseudomonas aeruginosa como representante de los Gram negativos oxidasa positivos, además es de los microorganismos más aerófilos que existen, por lo que sirve de control de calidad de la siembra en superficie y también de la proporción de agar-agar en los medios para las siembras en masa.

E.coli como representante de los Gram negativos oxidasa negativos. Al ser fermentadores facultativos, crecerán muy bien en masa y en superficie también.

Staphylococcus aureus como representante de los Gram positivos facultativamente anaerobios, de nuevo para comprobar la capacidad del agar elegido para el crecimiento en superficie de los aerobios y también en masa de los fermentadores facultativos.

Enterococcus faecalis como representante de los Gram positivos aerófilos, ideal para siembra en superficie y también para siembras en masa si hay poca proporción de agar-agar en el medio empleado.

5.4 Matrices empleadas

Muestra	Matriz	Muestra	Matriz
1	GEL CONTORNO DE OJOS	16	GEL ALOE
2	LOCION CORPORAL BEBÉ	17	CREMA GEL ACNÉ
3	GEL HIGIENE INTIMA	18	SERUM HIDRATANTE
4	AMPOLLAS ANTIEDAD PEELING	19	TONICO LIMPIADOR
5	PROTECTOR SOLAR TACTO SEDA	20	CREMA FACIAL HIDRATANTE
6	PROTECTOR SOLAR TACTO SECO	21	CREMA GEL EXFOLIANTE
7	PROTECTOR SOLAR FLUIDO LIGERO	22	MASCARA FACIAL REAFIRMANTE
8	LECHE CORPORAL HIDRATANTE	23	BALSAMO LABIAL
9	SERUM ANTIENVEJECIMIENTO DE LA PIEL	24	PROTECTOR SOLAR FACIAL INFANTIL 50
10	SERUM LIPOSOMAL CON VITAMINAS	25	EXTRACTO GINKGO BILOBA
11	GEL LIMPIADOR Y DESMAQUILLANTE	26	EXTRACTO CAMOMILA
12	CREMA ESPUMOSA SIN JABÓN	27	ACIDO FERULICO ANTIOXIDANTE
13	AGUA LIPOSOMAL DESMAQUILLANTE	28	NIACINAMIDA REDUCCIÓN ACNÉ
14	CREMA EXFOLIANTE	29	LIMPIADOR LIPOSOMAL ACIDO LAURICO
15	FLUIDO FACIAL ANTIOXIDANTE	30	LIPOSOMA ARBOL DE MORERA

6. Procedimiento

6.1 Operativa con muestras inoculadas.

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

- Preparamos 30 frascos estériles, cada uno con 90 mL de LPT Neutralizing Broth con 10 g de una muestra diferente, de los cuales habrá algunos "blancos" al azar de muestra sin cepas. En validaciones cuyo objetivo es la sensibilidad de un medio, tomaremos muestras de todos ellos para plaquiar y conocer la concentración inicial de aerobios en la muestra, por si en alguna muestra los hubiere poder descontarlos del recuento final y así poder comparar éste con el valor inóculo. Como en este caso el interés es ver la capacidad de recuento más rápido del PCA cromogénico con respecto al medio clásico TSA (exactitud relativa), no es necesario.
- NOTA: Si hubiéramos querido estudiar la reproducibilidad, la mitad de los frascos se deben inocular y analizar un día; y la otra mitad, otro día y/o por otro analista, que 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. Dada la imprecisión que esto añade al método, ya que las cepas y sus diluciones no se mantienen de un día para otro, es preferible no hacerlo.
- Reconstituimos las cepas de laboratorio en tubos de 10 ml de solución isotónica marina (Ringer con sales de mar, que recuperan mejor todo tipo de cepas al contener todos los oligoelementos necesarios). Con meticulosidad para no perder ninguna de las lentejas que conforman las mismas, atemperadas para que se disuelvan mejor, cuidando para que no se queden pegadas a las paredes del tubo (lo que dificultaría y retrasaría su disolución) y bajen al fondo, dejando 10-20 minutos que se empapen y agitando después con un vortex para conseguir una correcta homogeneización.
- Ya hicimos 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 ml final (=placa). Es necesario diluir más las cepas de alta concentración (en este caso *Pseudomonas aeruginosa* 10^7 ufc/lentícula y *Staphylococcus hominis* 10^7 ufc/lentícula en 10 ml del tubo inicial de solución isotónica marina, que equivale a 10^6 ufc/ml del tubo) pasando 1 ml del tubo inicial de 10 ml a un tubo de 9 ml de Ringer Marino 1/4 para conseguir la concentración de 10^5 ufc/ml del segundo tubo). Es más fácil partir de todas las cepas a la misma concentración exponencial para así no complicar los cálculos. Una vez determinado este valor traspasamos dicho volumen de inóculo a los frascos con muestras con micropipeta y puntas estériles. Tras ello, agitamos las muestras para su correcta homogeneización.
- Los microorganismos utilizados serán *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00025, *E.coli* WDCM 00090, *Staphylococcus hominis salvaje* PECJIT identificado genéticamente frente a Genbank y *Enterococcus faecalis* WDCM 00087, todo ellos como diana. Si esta validación fuese para el recuento de uno concreto de ellos (diana) y los demás fuesen acompañantes e interferentes, se añadirían éstos a concentraciones 2-3 veces superiores a la del diana. La concentración teórica de los distintos microorganismos inoculados en las muestras se detalla en la siguiente tabla:

Rango	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Bajo	<15	<15	<15	<15
Medio	20-50	20-50	20-50	20-50
Alto	70-200	-	68-200	62-123

- Hacemos placas duplicadas en cada muestra y en cada uno de sus tres rangos. En el rango bajo es simple placa duplicada en la dilución (-1), pero en los rangos medio y alto, es placa duplicada de la dilución (-1) en la segunda dilución (-2).

- Por cada muestra realizamos cuatro ensayos: dos en TSA por siembra en superficie de 0,1 mL y extensión con asa Digiralsky y otros dos en PCA cromogénico también por siembra en superficie de 0,1 mL y extensión con asa Digiralsky. Ambos medios se incuban (todas las placas juntas e introduciéndolas a la vez en la misma estufa) a 20-25°C durante 48 h ambos medios, y después un total de 72 h el PCA cromogénico y 5 días el TSA.
- Transcurrido el tiempo de incubación se hace el conteo de las colonias en cada una de las placas de cultivo.
- Si en el blanco realizado salen colonias, descontaremos su media (siempre que no sea >50% del valor inoculado, lo cual invalidaría el experimento). No procede, ya que los 6 blancos elegidos al azar han dado 0 colonias.

6.2 Control de la concentración de las cepas (tabla del "negro").

Lectura de los negros:

Ref colección Universal	Cepas MICROKIT	Concentración calculada	Rto. en placa TSA		Rto. en placa PCA cromogénico	
			2 días	5 días	2 días	3 días
WDCM00025	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40 ufc/0,1 mL	10 col	9 col	19 col	19 col
WDCM00090	<i>Escherichia coli</i>	40 ufc/0,1 mL	292 col	200 col	58 col	61 col
WDCM00087	<i>Enterococcus faecalis</i>	40 ufc/0,1 mL	40 col	40 col	50 col	48 col
PECJIT	<i>Staphylococcus hominis</i>	40 ufc/0,1 mL	9 col	9 col	22 col	22 col

Llama la atención el recuento en TSA de *E.coli*, 5-7 veces por encima del valor inóculo, lo cual habría que tener en cuenta en los resultados si volviere a ocurrir en ellos. En las demás cepas recupera mucho mejor el PCA cromogénico que el TSA y con valores más cercanos al valor inóculo (dentro de su orden de magnitud).

Cuando el recuento de los negros resulta significativamente diferente del valor certificado de las cepas, como ha sucedido con *E.coli* en TSA (por ejemplo, la siembra en masa o por filtración suelen bajar respectivamente 1 log y un 30% la concentración certificada), se consideran datos aberrantes, y se tomarán con precaución 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. Se concluye gracias al PCA cromogénico que las lenticulas se mantienen con un recuento y una variabilidad perfectos (en el mismo log) respecto al certificado en origen por el proveedor. Según criterio ISO 17025, muy estricto, si el valor obtenido estuviera fuera de la precisión certificada, se invalidaría este trabajo y habríamos de repetirlo con otro lote de cepas; pero nos parece un criterio demasiado ortodoxo para trabajar bajo él en microbiología.

7. Resultados

7.1 Rango **BAJO** (placas duplicadas de la dilución madre (-1))

Muestra	Cepa	Valor inóculo teórico	TSA 48 h	PCA-crom 48 h	TSA 5 días	PCA-crom 3 días
1	Blanco	0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
2	Blanco	0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
3	Esch	2	0, 0	0, 2	0, 0	0, 2
4	Pseud	2	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
5	Enter	2	2, 1	2, 5	2, 1	2, 5
6	Staph	2	0, 0	0, 0	1, 0	0, 0
7	Esch	5	3, 4	2, 0	4, 4	2, 0
8	Pseud	5	0, 0	0, 0	0, 0	1, 0
9	Enter	4	7, 5	6, 4	8, 5	6, 11
10	Staph	4	1, 1	1, 0	1, 1	1, 0
11	Esch	10	3, 5	7, 11	3, 7	7, 11
12	Pseud	10	1, 1	0, 0	1, 1	1, 1
13	Enter	9	8, 9	5, 4	8, 9	5, 4
14	Staph	9	2, 2	3, 1	2, 2	3, 2
15	Esch	13	18, 16	29, 25	18, 16	29, 27
16	Pseud	12	7, 2	6, 3	7, 2	7, 3
17	Enter	11	2, 0	0, 0	2, 0	1, 1
18	Staph	11	1, 1	4, 3	2, 3	7, 5
19	Esch	14	18, 14	15, 6	18, 16	15, 11
20	Pseud	14	6, 6	5, 5	6, 6	5, 5
21	Enter	13	0, 0	1, 0	1, 2	1, 0
22	Staph	13	5, 5	13, 9	6, 5	13, 9
23	Esch	16	20, 36	36, 40	30, 58	36, 42
24	Pseud	16	5, 12	13, 8	5, 13	14, 8
25	Enter	15	1, 0	2, 6	1, 0	2, 6
26	Staph	15	3, 2	4, 1	3, 2	5, 1
26	Esch	18	3, 3	3, 3	3, 4	4, 3
28	Pseud	18	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
29	Enter	17	24, 25	32, 32	25, 28	32, 36
30	Staph	17	Incont, incont	5, 8	Incont, incont	5, 8
Σ ambas placas			290	370	342	405
Comparativa total				128% más que TSA en 48h, 108% más que TSA en 5 días	118% más que TSA 48h y 92% menos que PCA cromogénico en sólo 48h	118% más que TSA 5d y 109% más que PCA crom 48h

Esch: *E.coli* Pseud: *Pseudomonas aeruginosa* Enter: *Enterococcus faecalis* Staph: *Staphylococcus hominis*

Los resultados en color rojo se descartan como aberrantes, claros fallos en la dispensación de inóculos, al no ser interpolables con los resultados anteriores y posteriores de la misma cepa, o al ser Incontables, o al haber en la placa doble o nulo inóculo,

4 placas incontables en TSA, ninguna incontable en PCA-cromogénico

36 resultados descartados por aberrantes de Rango BAJO de los 240 totales (15%)

En la tabla de rango bajo es donde podremos estudiar la precisión de pares de placas. En las de rangos medio y alto no, al provenir cada par de una dilución diferente

También en la tabla de recuento bajo es donde más debemos fijarnos, ya que en el día a día son los recuentos más significativos: si la Normativa habla de <1.000 ufc/g, al diluir 10 g de muestra en 90 mL de LPT Neutralizing Broth (-1) y tomar por cada placa 0,1 mL de los 100 mL resultantes (=0,01 g), si hubiera 1000 ufc/g obtendríamos 10 colonias. La estrategia del laboratorio de añadir 0,2 ml/placa es excelente, ya que así conseguimos que 1000 ufc/g \equiv 20 colonias, que ya está por encima del estándar 15 colonias/placa que define cuando empieza el recuento y hasta donde termina el “número estimado”. Y además, en las muestras de cosmética donde es probable que caigan en manos de inmunocomprometidos, donde la Normativa habla de <100 ufc/g, el laboratorio siembra 1 mL de la solución madre (-1) en masa (0,1 g de muestra), por lo que 100 ufc/g equivalen a 10 colonias/placa.

Y en este rango bajo, el PCA cromogénico obtiene en 48h un 128% de más colonias que el TSA.

Y en 3 días, el PCA cromogénico (Maxim Rapid Agar) obtiene en sólo 72h, un 118% más colonias que el TSA en 5 días, en los rangos bajos de recuento en placa

Para colmo, el PCA cromogénico (Maxim Rapid Agar) en sólo 2 días (48 h) obtiene un 108% más colonias que el TSA en 5 días, en los rangos bajos de recuento en placa.

Por lo que perfectamente ya lo puede sustituir sin necesidad de observar lo que ocurre en los rangos medio y alto, que son menos significativos en microbiología cosmética a causa de los máximos normativos arriba indicados.

Por otra parte, incubar 5 días en TSA en vez de 2 días, implica obtener un 118% más colonias que incubando 48 horas, lo cual se sale del $\pm 10\%$ clásico de tolerancia en microbiología, y no permite extrapolar resultados a 5 días con un factor de corrección x 118 por el hecho de incubar el TSA sólo 48h

E incubar 3 días en PCA cromogénico en vez de 48 horas, en el rango bajo, implica obtener un 109% más de colonias que incubando 48 horas, por lo que los resultados a 2 y a 3 días a 20-25°C pueden considerarse equivalentes, al ser la diferencia inferior al 10%. También se puede aplicar un factor de corrección, multiplicando el recuento de 48 h por 1,09, para conseguir una aproximación al recuento en 3 días, aunque un 9% en microbiología se considera despreciable.

Aunque si se buscara en los rangos extraordinariamente bajos (1-2 colonias/placa) sí que valdría la pena esperar al recuento en 3 días, como se observa en varias muestras donde el TSA recuenta 0 y el PCA cromogénico acaba enumerando 1 ó 2 colonias/placa.

Otras observaciones de la casuística: Pseudomonas no ha seguido una clara linealidad en el rango bajo, ya que hay muestras con más concentración que obtienen recuentos más bajos. También fallan en linealidad en el rango bajo algunas diluciones de las otras tres cepas.

▪ 7.2 Rango **MEDIO** (placas duplicadas: dilución -1 respecto a dilución -2)

Muestra	Cepa	Valor inóculo teórico	TSA 48 h (-1), (-2)	PCA-crom 48 h (-1), (-2)	TSA 5 días (-1), (-2)	PCA-crom 3 días (-1), (-2)
1	Blanco	0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
2	Blanco	0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
3	Esch	20	9, 0	8, 0	9, 0	10, 0
4	Pseud	20	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
5	Enter	19	Incont, 3	112, 1	Incont, 9	112, 1
6	Staph	19	10, 1	8, 0	10, 1	8, 0
7	Esch	25	18, 1	27, 0	22, 1	32, 1
8	Pseud	25	8, 0	0, 0	8, 0	3, 1
9	Enter	21	48, 9	80, 3	165, 9	94, 3
10	Staph	24	5, 0	4, 0	6, 0	4, 0
11	Esch	29	7, 0	6, 2	14, 0	10, 2
12	Pseud	30	3, 0	4, 0	3, 0	4, 0
13	Enter	23	100, 1	98, 5	74, 1	98, 5
14	Staph	29	7, 1	12, 0	9, 1	13, 0
15	Esch	34	8, 1	3, 2	12, 1	4, 2
16	Pseud	35	14, 3	13, 5	14, 3	14, 5
17	Enter	25	2, 0	3, 1	2, 0	3, 1
18	Staph	33	14, 0	9, 1	15, 0	9, 1
19	Esch	39	7, 0	13, 3	11, 0	14, 3
20	Pseud	40	16, 3	13, 1	16, 3	15, 2
21	Enter	27	0, 0	0, 0	0, 1	0, 0
22	Staph	38	15, 3	13, 2	18, 3	13, 3
23	Esch	44	7, 2	17, 1	12, 2	18, 1
24	Pseud	45	Incont, 1	16, 3	Incont, 1	17, 4
25	Enter	29	29, 0	24, 1	29, 0	24, 1
26	Staph	44	4, 0	10, 2	6, 0	10, 2
26	Esch	49	6, 0	5, 1	10, 0	5, 1
28	Pseud	50	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
29	Enter	31	70, 4	66, 7	108, 4	66, 7
30	Staph	49	Incont, 280	7, 3	Incont, 360	8, 3
Σ placas (-1) y ambas			394 (424)	455 (494)	403 (433)	481 (525)
Comparativa total				115-117% más que TSA 48h, 113-114% más que TSA 5 días	102-102% más que TSA 48h y 88-89% menos que PCA cromogénico en sólo 48h	119-121% más que TSA 5d y 105-106% más que PCA crom 48h

NOTA: Hemos buscado un valor medio de 30 en vez del típico de 50 porque en microbiología cosmética importan más los rangos bajos, a causa de los valores límite Normativos

Esch: *E.coli* Pseud: *Pseudomonas aeruginosa* Enter: *Enterococcus faecalis* Staph: *Staphylococcus hominis*

Los resultados en color rojo se descartan como aberrantes, claros fallos en la dispensación de inóculos, al no ser interpolables con los resultados anteriores y posteriores de la misma cepa, o al ser Incontables, o al haber en la placa doble o nulo inóculo,

6 placas incontables en TSA, ninguna incontable en PCA-cromogénico

64 resultados descartados por aberrantes de Rango MEDIO de los 240 totales (26,7%), son muchos los aberrantes que interferirían en unas conclusiones certeras en este rango de recuento en placa.

En la tabla de rango medio no podremos estudiar bien la precisión de pares de placas, ya que cada placa de un par procede de una dilución diferente.

Y esto se hizo para comprobar si había alguna matriz entre las elegidas que tuviera “efecto matriz” o “excesivo poder inhibitorio intrínseco”. Los resultados muestran claramente que no es así, y la dilución mayor da, como es de esperar, un recuento menor. En la mayoría de las muestras, una dilución 10 veces mayor, supone un recuento 1 log inferior, pero curiosamente hay algunas (muestras 9, 13 y 29) donde la dilución 10 veces mayor, supone un recuento casi 2 log inferior, aunque esto también puede ser achacable a la incertidumbre del método microbiológico en las diluciones.

La tabla de rango medio no es tan importante en microbiología cosmética como la de rango bajo, como ya hemos explicado en los comentarios de la misma.

En este rango medio, el PCA cromogénico obtiene en 48h un 115-117% más colonias que el TSA en el mismo tiempo, en los rangos medios de recuento en placa

Y en 3 días, el PCA cromogénico (Maxim Rapid Agar) obtiene en sólo 72h, un 119-121% más colonias respecto al TSA en 5 días, en los rangos medios de recuento en placa

Para colmo, el PCA cromogénico (Maxim Rapid Agar) en sólo 2 días (48h) obtiene un 113-114% más colonias que el TSA en 5 días, en los rangos medios de recuento en placa.

Por otra parte, incubar 5 días en TSA en vez de 2 días, implica obtener un 141-144% más colonias que incubando 48 horas, lo cual se sale del $\pm 10\%$ clásico de tolerancia en microbiología, y no permite extrapolar resultados a 5 días por un factor de corrección x144 incubando el TSA sólo 48h, lo cual imposibilita el uso del TSA en sólo 48 h.

E incubar 3 días en PCA cromogénico en vez de 48 horas, en el rango medio, implica obtener un 105-106% más de colonias que incubando 48 horas, por lo que los resultados a 2 y a 3 días a 20-25°C pueden considerarse equivalentes, al ser la diferencia inferior al 10%. También se puede aplicar, si se desea, un factor de corrección, multiplicando el recuento de 48 h por 1,05-1,06, para conseguir una aproximación al recuento en 3 días, aunque un 5-6% en microbiología se considera despreciable y no vale la pena esta corrección.

Otras observaciones de la casuística: Pseudomonas no ha seguido una clara linealidad en el rango medio, ya que hay muestras con más concentración que obtienen recuentos más bajos. También fallan en linealidad en el rango medio algunas diluciones de las otras tres cepas.

▪ 7.3 Rango **ALTO** (placas duplicadas: dilución -1 respecto a dilución -2)

Muestra	Cepa	Valor inóculo teórico	TSA 48 h (-1), (-2)	PCA-crom 48 h (-1), (-2)	TSA 5 días (-1), (-2)	PCA-crom 3 días (-1), (-2)
1	Blanco	0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
2	Blanco	0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
3	Esch	69	4, 2	9, 1	5, 2	9, 1
4	Pseud	70	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
5	Enter	62	92, 8	216, 4	216, 8	243, 4
6	Staph	68	16, 2	26, 4	18, 2	26, 4
7	Esch	84	17, 4	36, 5	17, 6	36, 5
8	Pseud	85	14, 4	10, 1	14, 5	13, 2
9	Enter	84	224, 16	184, 3	244, 15	228, 3
10	Staph	83	8, 2	22, 1	13, 2	22, 1
11	Esch	99	13, 3	21, 3	22, 0	23, 3
12	Pseud	100	8, 0	8, 2	8, -	9, 2
13	Enter	98	460, 5	224, 22	124, 5	224, 22
14	Staph	98	24, 1	24, 1	16, 2	25, 1
15	Esch	123	17, 2	25, 9	24, 2	25, 9
16	Pseud	125	30, 7	46, 3	35, 7	51, 3
17	Enter	123	13, 2	13, 0	12, 2	14, 1
18	Staph	122	13, 5	19, 4	14, 4	24, 4
19	Esch	148	12, 5	20, 6	30, 5	26, 6
20	Pseud	150	Incont, 50	144, 30	Incont, Incont,	144, 32
21	Enter	148	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
22	Staph	146	45, 5	36, 7	44, 6	41, 7
23	Esch	173	36, 5	8, 7	42, 5	56, 7
24	Pseud	175	Incont, 100	Incont, 104	Incont, 68	Incont, 104
25	Enter	173	28, 1	36, 4	29, 2	36, 4
26	Staph	171	25, 6	22, 6	30, 7	22, 6
26	Esch	198	21, 4	15, 6	22, 5	15, 6
28	Pseud	200	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
29	Enter	198	25, 4	14, 1	22, 4	22, 2
30	Staph	196	Incont, 340	36, 8	Incont, Incont,	36, 8
Σ placas (-1) y ambas			735 (1.270)	1.214 (1.456)	1.001 (1.164)	1.371 (1.635)
Comparativa total				115-165% más que TSA 48h, 121-125% más que TSA 5 días	92-136% más que TSA 48h y 82-92% menos que PCA cromogénico en sólo 48h	137-140% respecto TSA 5d y 112-113% más que PCA crom 48h

Esch: *E.coli* Pseud: *Pseudomonas aeruginosa* Enter: *Enterococcus faecalis* Staph: *Staphylococcus hominis*

Los resultados en color rojo se descartan como aberrantes, claros fallos en la dispensación de inóculos, al no ser interpolables con los resultados anteriores y posteriores de la misma cepa, o al ser Incontables, o al haber en la placa doble o nulo inóculo,

8 placas incontables en TSA, 2 incontables en PCA-cromogénico

36 resultados descartados por aberrantes de Rango ALTO de los 240 totales (15%)

En la tabla de rango alto no podremos estudiar bien la precisión de pares de placas, ya que cada placa de un par procede de una dilución diferente.

Y esto se hizo para comprobar si había alguna matriz entre las elegidas que tuviera “efecto matriz” o “excesivo poder inhibitorio intrínseco”. Los resultados muestran claramente que no es así, y la dilución mayor da, como es de esperar, un recuento menor. En la mayoría de las muestras, una dilución 10 veces mayor, supone un recuento 1 log inferior, pero curiosamente hay algunas (muestras 5, 9, y 13; la 9 y la 13 repiten lo que les sucedió en el recuento medio) donde la dilución 10 veces mayor, supone un recuento casi 2 log inferior, aunque esto también puede ser achacable a la incertidumbre del método microbiológico en las diluciones.

La tabla de rango alto no está importante en microbiología cosmética como la de rango bajo, como ya hemos explicado en los comentarios de la misma.

Y la tendremos más en cuenta que la de rango medio, porque la proporción de aberrantes baja del 26,7% al 15% (proporción idéntica ésta a la del rango bajo)

En este rango alto, el PCA cromogénico obtiene en 48h un 115-165% más colonias que el TSA: 165% si sólo tenemos en cuenta las placas que han resultado más fiables, las de la dilución madre (-1).

Y en 3 días, el PCA cromogénico (Maxim Rapid Agar) obtiene en sólo 72h, un 137-140% más colonias que el TSA en 5 días.

Y en 2 días, además, el PCA cromogénico (Maxim Rapid Agar) obtiene en sólo 48h, un 121-125% más colonias que el TSA en 5 días, en los rangos altos de recuento en placa.

Por otra parte, incubar 5 días en TSA en vez de 2 días, implica obtener un 136% más colonias que incubando 48 horas (el 92% calculado entre la suma de resultados de ambas diluciones es aberrante, porque no puede haber más recuento en las mismas placas a las 48h que a los 5 días; esta aberración se explica al haber más incontables a 5 días que no suman, que en 48 horas)

E incubar 3 días en PCA cromogénico en vez de 48 horas, en el rango alto, implica obtener un 112-113% más de colonias que incubando 48 horas, por lo que los resultados a 2 y a 3 días a 20-25°C pueden considerarse casi equivalentes, al ser la diferencia cercana al 10%. También se podría aplicar, si se desea, un factor de corrección, multiplicando el recuento del rango alto de 48 h por 1,12-1,13, para conseguir una aproximación al recuento en 3 días, aunque ese 12-13% en microbiología es casi despreciable y no vale la pena tener en cuenta esta corrección.

Otras observaciones de la casuística: Pseudomonas no ha seguido una clara linealidad en el rango medio, ya que hay muestras con más concentración que obtienen recuentos más bajos. También fallan en linealidad en el rango alto algunas diluciones de las otras tres cepas.

Nota: No hemos trabajado para conocer la reproducibilidad (para eso está la posterior participación en servicios intercomparativos de estos tipos de matrices); de haberlo necesitado, simplemente repetiríamos el experimento con el mismo lote de cepas y haciendo duplicados idénticos, otro día y con otro analista. Y plasmaríamos los resultados en tablas como las de arriba, a fin de comparar cada muestra con su duplicado del otro día y del diferente analista. Pero precisamente para eso se trabaja después en servicios intercomparativos.

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 (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 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; e incluso se puede aplicar el test de Cochran para eliminar imprecisiones. En general se puede prescindir de estos test si se tiene experiencia y criterio para descartar a simple vista los resultados excesivamente desviados (como mínimo los ceros y los incontables, además de los que no interpolan bien entre recuentos lineales).
- 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 (es decir, el certificado dice por ejemplo 40 y nuestro negro dice >400 o <4). 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 *Aerobios*, 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 15-200 colonias/placa. Y se divide en 3: bajo (1-15 colonias/placa), medio (16-50 colonias /placa) y alto (51-200 colonias /placa). En microbiología cosmética el rango más importante es el bajo, porque es por donde nos vamos a mover cuando estemos cerca del límite Normativo de 1.000 ufc/g, que equivale a 10 colonias/placa cuando añadimos 0,1 mL de la solución madre de 10 g de cosmético en 90 mL de caldo neutralizante, es decir, cuando añadimos 0,01g de muestra/placa.
- **Exactitud:** cercanía de los resultados respecto al valor teórico en los tres rangos de recuento en placa. Elegimos como valor asignado el valor inóculo calculado 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 al recuento en los medios estándar).

- **Precisión:** medida de dispersión de los resultados obtenidos respecto a su media. Suelen medirse dos de sus componentes: 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:** escasez de falsos negativos empleando diferentes dianas
- **Especificidad exclusiva:** escasez de falsos positivos empleando diferentes interferentes. No procede en los recuentos de aerobios, ya que cualquier microorganismo es diana.
- **Robustez del parámetro:** Denominamos así la capacidad del parámetro *Recuento de Aerobios* 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). Por todo ello, no creemos en el cálculo de la incertidumbre en microbiología y consideramos que es una absurda pérdida de tiempo, máxime no habiendo, como no hay, ni puede haber, valores límite con los que compararse.

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 *Aerobios* 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. Aunque vienen dados ya fuera del experimento de validación, debemos tener en cuenta una serie de consideraciones:

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*. Pero en cosmética, es precisamente ahí donde está el límite Normativo (<1.000 ufc/g para cosmética en general, es decir, <10 colonias si se emplea la dilución -1 y se siembra 0,1 mL y <100 ufc/g para cosmética que pueda acabar

en manos de inmunodeprimidos, es decir, < 10 colonias si se emplea la dilución -1 y se siembra 1 mL. 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 (con respecto a los restantes 2/3 de la placa sin colonias).

En el caso de estudio se han fijado por normativa técnica en límite inferior 1 colonia/placa y en límite superior 200 colonias /placa.

El límite superior se puede solventar en caso necesario (placas incontables o confluentes) repitiendo el trabajo con diluciones decimales de la muestra, pero como nuestro límite de aceptabilidad en cosméticos es 10 colonias/placa, no tiene sentido profundizar en este rango.

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 colonias/placa". Reiteramos aquí la incongruencia que es exigir legislativamente <100 ó <1.000 ufc/g, con un método que solo es capaz de demostrar recuentos fiables cuando hay muchos más microorganismos presentes en la muestra).

No olvidemos que en realidad el recuento de cada placa (1 ml de muestra tratada), al estar ésta diluida a razón de 10 g + 90 ml LPT Broth (10^{-1}), es en realidad 0,1 g de muestra inicial. Esto provoca un sesgo en los recuentos en placa, al no ser capaces de contar por debajo de 15 colonias/placa, es decir, por debajo de 150 ó 1.500 ufc/g de muestra en 1 mL de la solución madre (muestra tratada). Por ello los resultados analíticos de recuento, cuando no nos salga ninguna colonia tras haber sembrado 1 mL, sólo podremos expresarlos como "recuento <150 ufc/g" y si en la placa saliesen por ejemplo 9 colonias, deberíamos expresarlo como "valor estimado <90 ufc/g"

En el rango medio del recuento en placa es lógicamente donde la incertidumbre es menor y por tanto los resultados suelen ser 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. De todas formas en cosméticos, por lo que acabamos de comentar en el párrafo anterior, el rango en el que más deberíamos centrarnos es el bajo.

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. Pero lo que realmente importa en esta validación es calcular la recuperación absoluta (comparando el recuento en PCA cromogénico, que es el medio que queremos validar porque ha demostrado ser mucho más rápido, al menos al incubar a 35°C, con respecto al TSA, como medio clásico oficial).

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.

Seremos prudentes con este parámetro, ya que lo que estamos comparando en esta validación no es lo bien o mejor que recupera el PCA cromogénico con respecto a cepas diana de concentración calculada, sino lo bien o mejor que recupera el PCA cromogénico respecto al TSA estándar y sobre todo, la rapidez en la obtención de sus resultados con respecto al TSA, que puede ahorrar a la industria cosmética mucho tiempo de incubación y, en definitiva, mucho stock de almacén de producto final en cuarentena. Sobre todo si se conjuga con un medio rápido del otro parámetro más lento que existe: el recuento de hongos (levaduras y mohos).

Resultados de exactitud

La Exactitud medida como **recuperación relativa** media % respecto a cepas cuantitativas certificadas (como criterio estándar, ver ejemplos de fertilidad mínima para medios generales y selectivos en los anexos de la Norma ISO 11133-2: 50-95%) no nos interesa en esta validación. Lo que queremos comprobar es la exactitud (y además la rapidez) del medio PCA cromogénico de MICROKIT con respecto al TSA estándar.

Exactitud absoluta entre el PCA cromogénico y el TSA a las 48 horas (2 días) a 20-25°C

Rango de Medida	Recuento en PCA cromogénico 48 h	Recuento en TSA 48h	Recuento PCA crom/TSA
BAJO	370 colonias/60 placas	290 colonias/60 placas	128%
MEDIO	455-494 colonias/60 placas	394-424 colonias/60 placas	115-117%
ALTO	1214-1456 colonias/60 placas	735-1270 colonias/60 placas	115-165%
Exactitud absoluta media			128%

Excelente, superior al 90% necesario según ISO 11133-2 e incluso >100% de excelencia en el mismo tiempo que el TSA.

Exactitud absoluta entre el PCA cromogénico a las 72 h (3 días) y el TSA a los 5 días a 20-25°C

Rango de Medida	Recuento en PCA cromogénico 3 días	Recuento en TSA 5 días	Recuento PCA crom/TSA
BAJO	405 colonias/60 placas	342 colonias/60 placas	118%
MEDIO	481-525 colonias/60 placas	403-433 colonias/60 placas	119-121%
ALTO	1371-1635 colonias/60 placas	1001-1164 colonias/60 placas	137-140%
Exactitud absoluta media			127%

Excelente, superior al 90% necesario según ISO 11133-2 e incluso >100% de excelencia en menos tiempo (ahorra 2 días) que el TSA.

Exactitud absoluta entre el PCA cromogénico a las 48 h (2 días) y el TSA a los 5 días a 20-25°C

Rango de Medida	Recuento en PCA cromogénico 48h	Recuento en TSA 5 días	Recuento PCA crom/TSA
BAJO	370 colonias/60 placas	342 colonias/60 placas	108%
MEDIO	455-494 colonias/60 placas	403-433 colonias/60 placas	113-114%
ALTO	1214-1456 colonias/60 placas	1001-1164 colonias/60 placas	121-125%
Exactitud absoluta media			116%

Excelente, superior al 90% necesario según ISO 11133-2 e incluso >100% de excelencia en mucho menos tiempo (ahorra 3 días) que el TSA.

Otras conclusiones interesantes:

El PCA cromogénico obtiene resultados muy similares cuando se incubaba a 25°C en 2 y en 3 días (48 h y 72 h)

Rango de Medida	Recuento en PCA cromogénico 48 h	Recuento en PCA cromogénico 72 h	Recuento 48/72h
BAJO	370 colonias/60 placas	405 colonias/60 placas	91,4%
MEDIO	455-494 colonias/60 placas	481-525 colonias/60 placas	94,6-94,1%
ALTO	1214-1456 colonias/60 placas	1371-1635 colonias/60 placas	88,5-89,1%
Exactitud absoluta media			91,54 % (>90%)

De modo que podemos reducir el tiempo de incubación de aerobios no asociados al hombre, sino al deterioro de producto (saprófitos a 25°C), de 5 días a sólo 2

En cambio el TSA no obtiene resultados fiables a las 48 horas y hay que esperar 5 días para que los recuentos sean fiables:

Rango de Medida	Recuento en TSA 48h	Recuento en TSA 5 días	Recuento PCA crom/TSA
BAJO	290 colonias/60 placas	342 colonias/60 placas	84,8%
MEDIO	394-424 colonias/60 placas	403-433 colonias/60 placas	97,8-97,9%
ALTO	735-1270 colonias/60 placas	1001-1164 colonias/60 placas	73,4% a -aberrante
Exactitud absoluta media			88,47 % (<90%)

Además en PCA cromogénico (2 de 360 placas) se minimiza el número de placas incontables, que son mucho más frecuentes en TSA (18 de 360 placas).

La conclusión es clara: podemos trabajar con plena confianza con PCA-cromogénico (Maxim Rapid Agar) y ahorrar 2 ó incluso, si nos conviene, 3 días de incubación. Por tanto, los aerobios a 20-25°C dejan de ser uno de los 2 hándicaps que nos obligaban hasta ahora a retener el producto final durante 5 días. Falta que validemos el Rapid YM Agar para que, si en el recuento de hongos sucede lo mismo, la cuarentena de stock de producto terminado la pasen a marcar desde ahora los patógenos lentos (sobre todo *Staphylococcus aureus*, con sus 3-4 días entre enriquecimiento y aislamiento en placa).

8.3 Precisión

Mide la dispersión de los resultados obtenidos en las diferentes réplicas respecto el valor promedio.

Tiene dos componentes: repetitividad (la que obtenemos con réplicas en nuestro laboratorio con experimentos como el de hoy) y reproducibilidad (la que obtenemos mediante z-scores en ensayos intercomparativos. En validaciones más estrictas, ADEMÁS, con replicas de este experimento en diferentes días para cada analista y con todos los analistas).

Mediremos la precisión-repetitividad, en cada uno de los tres rangos, como desviación estándar relativa, como coeficiente de variación CV: % (imprecisión) que es la "precisión media" relativa a (dividida por) el recuento medio obtenido (la cifra de la derecha del \pm dividida por la cifra de la izquierda del mismo). Este valor es análogo en su inversa a los empleados en los ensayos intercomparativos "Z-scores" (logarítmicamente, la cifra de la izquierda del \pm dividida por la cifra de la derecha del mismo), por lo que tiene el mismo valor estadístico que éstos. Así no nos perderemos en herramientas estadísticas que no entenderíamos y tampoco nos iban a dar mayor fiabilidad en los resultados.

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 la componente de la incertidumbre, la cual en microbiología no se puede aplicar como en química, ya que 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") no son medibles. Otros argumentos de peso en contra de un cálculo veraz de la incertidumbre microbiológica expandida son: 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.

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

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 del 100%.

En las z-scores empleadas en los servicios intercomparativos, se admite que los valores logarítmicos son adecuados mientras se mantengan entre ± 2 . De modo que, análogamente, mientras el valor absoluto del CV no sea superior a 1 (al 100%), ya que la desviación nunca puede admitirse si es mayor al valor medio, consideraremos correcta la repetitividad. En los casos en que sea superior al 100%, se descartarán dichos casos por aberrantes. Cuanto menor sea el valor del CV% (que mide la imprecisión), más correcta será la precisión demostrada. Valores de CV% superiores al 70% deben hacernos pensar en mejorar el experimento.

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). 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.

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, así como los 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.

Resultados de precisión (sólo en el rango bajo)

Nos centraremos en los resultados del rango bajo, ya que en el rango medio y en el rango alto, los duplicados de placas a diferente dilución, tenían la misión exclusiva de detectar a ver si había matrices de elevado poder inhibitorio intrínseco, que requieren el caldo LPT Neutralizing a doble concentración, o incluso exigen trabajar a la dilución (-2). Y una vez hecha su labor (→ no hay ninguna de esas matrices), no aportarían nada al estudio de la precisión del método y de los analistas.

Tampoco era el motivo de esta validación centrarnos en este parámetro, que en este caso mide sobre todo el trabajo repetitivo del analista en los duplicados de placas, pero aun así estudiaremos los pares de cada placa del rango bajo. Los resultados de TSA a 5 días y de PCA cromogénico a 2 días:

Muestra	TSA 5 días			PCA cromogénico 48h		
	Datos, Media	Sm	CV% Sm/Media	Datos, Media	Sm	CV% SM/Media
1	0/0 0	0	-	0/0 0	0	-
2	0/0 0	0	-	0/0 0	0	-
3	0/0 0	0	-	0/2 1	1,41	141%
4	0/0 0	0	-	0/0 0	0	-
5	2/1 1,5	0,71	46,7%	2/5 3,5	2,12	60,6%
6	1/0 0,5	0,71	142%	0/0 0	0	-
7	4/4 4	0	0	2/0 1	1,41	141%
8	0/0 0	0	-	0/0 0	0	-
9	8/5 6,5	2,12	32,6%	6/4 5	1,41	28,2%
10	1/1 1	0	0	1/0 0,5	0,71	142%
11	3/7 5	2,83	56,6%	7/11 9	2,83	31,4%

12	1/1 1	0	0	0/0 0	0	-
13	8/9 8,5	0,71	8,4%	5/4 4,5	0,71	15,8%
14	2/2 2	0	0	3/1 2	1,41	70,5%
15	18/16 17	1,41	8,29%	29/25 27	2,83	10,5%
16	7/2 4,5	3,53	78,4%	6/3 4,5	2,12	47,11%
17	2/0 1	1,41	141%	0/0 0	0	-
18	2/3 2,5	0,71	28,4%	4/3 3,5	0,71	20,3%
19	18/16 17	1,41	8,3%	15/6 10,5	6,36	60,6%
20	6/6 6	0	0	5/5 0	0	0
21	1/2 1,5	0,71	47,3%	1/0 0,5	0,71	142%
22	6/5 5,5	0,71	12,9%	13/9 11	2,83	25,7%
23	30/58 44	19,80	45%	36/40 38	2,83	7,4%
24	5/13 9	5,66	62,9%	13/8 10,5	3,54	33,7%
25	1/0 0,5	0,71	142%	2/6 4	2,83	70,7%
26	3/2 2,5	0,71	28,4%	4/1 2,5	2,12	84,8%
27	3/4 3,5	0,71	20,3%	3/3 3	0	0
28	0/0 0	0	-	0/0 0	0	-
29	25/28 26,5	2,12	8%	32/32 32	0	0
30	Incont./incont	-	-	5/8 6,5	2,12	32,6%
TOTAL	-	-	39,2 ± 45,3	-	-	53,0 ± 49,0

Como es habitual y lógico, y aun que los datos parecen decir lo contrario, el medio de cultivo no tiene incidencia en la precisión.

Se observa siempre una mayor precisión (menor CV %) en microbiología, en los rangos medio y alto (<10%); el rango bajo es el que más imprecisión tiene siempre, aunque en este caso sigue siendo adecuada (< 70%).

La precisión resulta bastante similar en ambos medios, ya que la precisión es una variable que depende más del analista que del medio. Como criterio de aceptabilidad debe saberse que los CV cuyo valor absoluto es > 100% no son admisibles. 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 del 19-50 % son habituales en las cepas cuantitativas de alta calidad como las empleadas. CV inferiores al 25% son considerados excelentes por los estándares de calidad más elevados. Los que obtenemos en esta validación son por tanto correctos, al no superar en ninguno de los dos medios ni siquiera el 70%.

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. Nosotros hemos basado el criterio de aceptabilidad de la precisión en lo que nos piden los clientes acreditados ISO 17025.

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

Si hemos trabajado con diferentes concentraciones calculadas para un mismo rango (por ejemplo empleando un solo microorganismo en cada muestra), la gráfica de linealidad será diferente para cada concentración teórica o microorganismo.



Rango de Medida y valor estimado medio	Rtos. medios en TSA, 5 días	Rtos. medios en PCA cromogénico, 2 días
BAJO: 10 ufc/inóculo	342/60 col/placa = 5,7	370/60 col/placa = 6,2
MEDIO: 30 ufc/inóculo	403/60 col/placa = 6,7	455/60 col/placa = 7,6
ALTO: 119 ufc/inóculo	1.001/60 col/placa = 16,7	1.214/60 col/placa = 20,2

En nuestro caso la linealidad ha quedado demostrada porque las medias obtenidas de los recuentos en placa van subiendo conforme suben los valores inóculo, en cada uno de los rangos, aunque no de una forma tan lineal como ocurre en otras validaciones. Tampoco nos importa, porque la meta en microbiología cosmética es el rango bajo, al ser el valor límite Normativo, con los cálculos efectuados en esta validación y en el trabajo habitual, de 10 colonias /placa. Y queda mejor demostrado en PCA cromogénico (entre 6,2 y 20,2 colonias/placa) que en TSA (entre 5,7 y 16,7 colonias/placa). Aunque no era este parámetro el objetivo de esta validación, ya que la linealidad es algo inherente al método de recuento en placa, y tampoco aporta nada nuevo a nuestro objetivo de conseguir reducir los tiempos de incubación, objetivo prioritario de esta validación.

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

En el rango bajo, sin tener en cuenta valores normalmente indetectables a causa de la incertidumbre (como son sólo 2 ufc/inóculo), hay un falso negativo en ambos medios de *Pseudomonas aeruginosa* en la muestra 28. En el rango medio, de nuevo falso negativo en ambos medios de *Pseudomonas aeruginosa* en la muestra 28, y también en la 4. Y en el rango alto, otra vez falso negativo en ambos medios de *Pseudomonas aeruginosa* en las muestras 4, y 28, lo que hace sospechar que estas muestras son inhibitorias para este microorganismo. Y de *Enterococcus faecalis* en la muestra 21.

Hay otros 2 falsos negativos, cada uno sólo en uno de los dos medios:

Pseudomonas aeruginosa en la muestra 8 a concentración baja sólo en TSA

Enterococcus faecalis en la muestra 21 a concentración media sólo en PCA cromogénico

De modo que en el total de 180 muestras (30 x 3 rangos x 2 medios) hay 14 con falso negativo de estos dos microorganismos entre ambos medios, mientras *E.coli* y *Staphylococcus hominis* no han sufrido ningún caso de falsos negativos.

La sensibilidad inclusiva es pues del $1-(14/180) \times 100 = 92,22 \%$, superior al típico 90% aunque inferior al estricto 95%

8.6 Especificidad exclusiva: escasez de falsos positivos con diferentes interferentes. No procede en un recuento de aerobios totales, donde no hay cepas interferentes ni acompañantes, que puedan dar lugar a falsos positivos, sólo cepas diana.

8.7 Robustez del parámetro aerobios totales: precisión entre los diferentes métodos ensayados. Se puede equiparar en este caso a la exactitud, que ya vimos en su capítulo que era muy buena entre ambos métodos:

128% del PCA cromogénico respecto al TSA en 48 h

127% del PCA cromogénico en 3 días respecto al TSA en 5 días

116% del PCA cromogénico en 2 días respecto al TSA en 5 días

De modo que se puede considerar un parámetro bastante robusto: no hay enormes diferencias en el recuento entre ambos medios

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 en la introducción de la precisión, no son medibles; por tanto el valor que obtenemos de la incertidumbre es muy inferior a la realidad. Si se desea aplicar la fórmula de incertidumbre más básica, es esta:

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

Unas incertidumbres (sin tener en cuenta la componente de las diluciones) calculadas, cercanas al 75%, 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.

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 (que además no procedería en un recuento de aerobios), 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 la posibilidad de su cálculo.

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

1ª La **exactitud** absoluta entre el PCA cromogénico (Maxim Rapid Agar) y el TSA a las 48 horas (2 días) a 20-25°C es del **128%**, excelente, superior al 90% necesario según ISO 11133-2 e incluso >100% de excelencia en el mismo tiempo que el TSA.

2ª La **exactitud** absoluta entre el PCA cromogénico (Maxim Rapid Agar) a las 72 h (3 días) y el TSA a los 5 días a 20-25°C es del **127%**, excelente, superior al 90% necesario según ISO 11133-2 e incluso >100% de excelencia en menos tiempo (ahorra 2 días) que el TSA.

3ª La **exactitud** absoluta entre el PCA cromogénico (Maxim Rapid Agar) a las 48 h (2 días) y el TSA a los 5 días a 20-25°C es del **116%**, excelente, superior al 90% necesario según ISO 11133-2 e incluso >100% de excelencia en mucho menos tiempo (ahorra 3 días) que el TSA.

4ª La **exactitud** del PCA cromogénico (Maxim Rapid Agar) frente al TSA a 25°C es > del 50%, > 70%, >90% y, lo que marca la diferencia: >100% en los 3 rangos del recuento en placa, por lo que cumple el criterio de aceptabilidad más estricto. De modo que podemos afirmar que es mejor medio (recuenta un número superior de colonias procedentes de las ufc's de la muestra) y mucho más rápido (en sólo 2 días) que el TSA estándar en 5 días. Se sabe por otras validaciones del proveedor, que a 35°C, el PCA cromogénico es todavía más rápido (24h), por lo que desde ahora, también podemos usarlo de rutina en los recuentos de aerobios a 35°C, que también leemos en 2 días (en vez de en uno) por comodidad.

5ª La **precisión** medida como Coeficiente de Variación CV%, es del 39,2% en TSA a 5 días y del 53% en PCA cromogénico (Maxim Rapid Agar) a 2 días a 25°C, ambas inferiores al 70% estándar, por lo que cumplen ambos con este criterio de la repetitividad.

6ª La **Linealidad**, la **Selectividad inclusiva** (la **Especificidad exclusiva** no procede en un recuento de aerobios) y la **Robustez paramétrica** han quedado suficientemente demostradas en los dos medios. La **incertidumbre microbiológica** no se puede medir, por más que las entidades de acreditación ISO 17025 se empeñen en calcular una incertidumbre completamente sesgada, basada solo en los datos de precisión, y que por tanto se puede calcular a raíz de su fórmula, con los datos de precisión, por lo que no sirve para nada, al no haber criterios de aceptabilidad para ella.

7ª Por todo ello, se considera validado el parámetro de recuento de *Aerobios* en nuestras muestras, empleando PCA cromogénico (Maxim Rapid Agar) de MICROKIT frente al TSA, con mejores resultados: recuentos medios más elevados, más cercanos a la realidad; menor proporción de placas incontables y recuentos fiables muchísimo más rápidos (2 días en vez de 5 días) incluso para la población de aerobios no ligados al hombre (que crecen a 25°C y deterioran los productos una vez almacenados). Y por supuesto ya se validó internamente su recuento con la máxima exactitud fiable a 35°C en sólo 18-24h.

Se complementa y se mantiene la presente validación mediante la participación en ejercicios de **Intercomparación** con otros laboratorios a lo largo del año, específicos para cosméticos, como el de ielab. Aunque también sería necesario participar en servicios intercomparativos de aguas de uso cosmético, si existen, al ser la materia prima potencialmente más conflictiva que tenemos y origen típico de *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*.

Se considerará caducada la presente validación, y por ello habrá que repetirla, o al menos emularla bajo el concepto de “verificación”, 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 (aunque dicha fórmula no está totalmente publicada, a causa de sus factores doping y sus cromógenos termoestables), cambios de equipos relevantes, cambio de tipos de muestras, cambio del procedimiento, cambio de instalaciones...

10. Bibliografía

- *Guía para la validación de ensayos microbiológicos y ejemplos de protocolos*. MICROKIT, 2006.
- Real Farmacopea Española, 3ª edición.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. “**Manual**” para el Control Microbiológico de Productos Cosméticos. 1994.
- Validación de análisis microbiológicos de cosméticos. 11 pp. MICROKIT © 09-Julio-2009.
- ISO 21149 Recuento de aerobios en productos cosméticos.
- Laboratorios MICROKIT, S.L. “Manual de medios de cultivo y kits”. 2005.
- La mejora de la calidad analítica mediante ensayos intercomparativos. Sanchis, J. Laboratorios MICROKIT, S.L. y otros autores. Congreso microbiología Cáceres. Septiembre 2005. Técnicas de Laboratorio, Noviembre 2005.
- Informes intercomparativos cuatrimestrales SEILAPARFUM desde Febrero de 2005 hasta Noviembre de 2021.
- Protocolo GLOBAL VALIDADO para la ejecución correcta de análisis de cosméticos (e intercomparativos SEILAPARFUM) (31 páginas)

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- Tablas de resultados “de campo”

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

Personal del laboratorio cosmético que contrató esta validación

Jorge Sanchis Solera (Microkit y KosmLab), asesor ISO9001 en validación



Valencia, 15 de Febrero de 2023

ANEXO 1: Estudio de las Posibles causas de aparición de resultados anómalos de anteriores validaciones

- Las muestras se irradiaron en bolsas estériles cuya capacidad no permitía añadir directamente los 90ml de LPT, con lo cual las muestras tuvieron que traspasarse a bolsas stomacker, produciéndose un error de pesada de muestra durante el cambio de bolsa.
- El añadir el inóculo a la bolsa de stomacker dentro de la campana de flujo laminar dificultaba el trabajo por un problema de espacio, de forma que parte del inóculo resbalaba por la pared de la bolsa, no llegando de forma clara al fondo con la muestra. Aunque luego se homogeneizasen en stomacker, creemos que puede haberse producido alguna pérdida de inóculo.
- Desde que se finalizó la homogeneización de las bolsas inoculadas en el stomacker hasta la siembra en las placas, transcurrió un tiempo excesivo, de forma que la misma sedimentación de la muestra produce un arrastre de los microorganismos inoculados, ocasionando recuentos más bajos.
- Por un problema de horario, se tuvo que interrumpir el experimento para ir a comer. Cuando se reinició y se inocularon las placas, se comprobó que los medios de cultivo que había fundidos se habían solidificado en parte. Estos medios tuvieron que volverse a fundir, lo cual ocasionó una pérdida de tiempo estando ya las placas con el inóculo. Al ser inóculos de muestras ricas en proteínas y grasas, éste queda adherido al fondo de la placa no permitiendo una mezcla uniforme con el agar añadido. Se producen solapamientos de colonias, no siendo los recuentos fiables.
- Al tener que refundir los medios se puede haber producido un deterioro en componente cromogénico y nutrientes de éstos, que haya ocasionado el funcionamiento inadecuado del medio de cultivo.
- Al hacer los “negros” sólo en un medio, no hemos podido comprobar cual es la concentración actual de una de las cepas que no crece en el mismo, de modo que hemos tenido que fiarnos 100% del certificado del proveedor de la cepa.

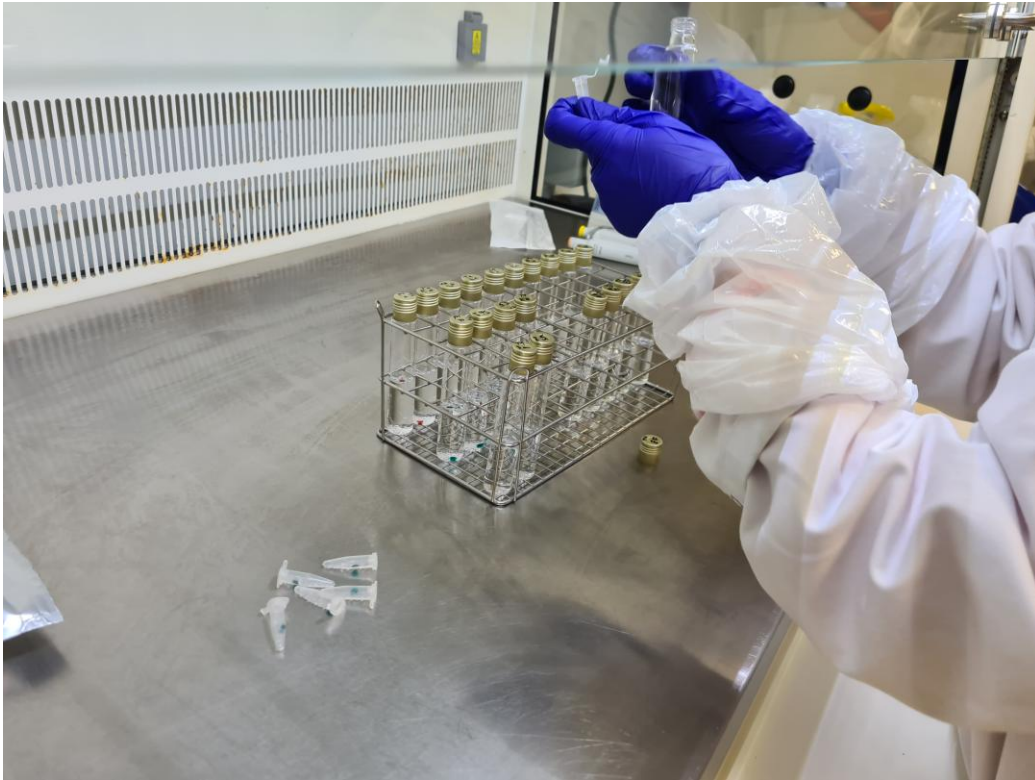
ANEXO 2: Propuestas de mejora para próximas validaciones

- Irradiar las muestras pesadas directamente en la bolsa de stomacker para evitar pérdidas y excesivas manipulaciones. En cosméticos simplemente usar muestras de lotes que no tuvieron problemas microbiológicos.
- Añadir el inóculo hasta el fondo de la bolsa, evitando que parte del mismo quede en las paredes, de esta forma la homogeneización es más correcta.
- Reducir al máximo el tiempo entre homogeneización en stomacker y siembra del inóculo en placas, para evitar problemas de sedimentación de bacterias por la propia muestra.

- Reducir al máximo el tiempo de inoculación de placa y vertido y homogeneización con el agar, para evitar que el inóculo se adhiera al fondo de la placa y se pueda mezclar bien con el agar.
- Controlar la Tª de mantenimiento de los medios fundidos para evitar solidificaciones y tener que volverlos a fundir.
- Utilizar tubos de mayor diámetro para la preparación de los inóculos para facilitar la disolución de las lentejas de cepas utilizadas. El LPT Neutralizing Broth dispersa mejor las ufc que el Ringer marino al 9%.
- Hacer los negros también en medio general para comprobar la concentración total de todos los microorganismos.
- Ajustar el pH en matrices que no sean neutras, durante la inactivación de conservantes, y protocolizarlo para siempre
- Realizar los negros una semana antes de la validación, para evitar emplear cepas que con nuestros medios salgan a concentraciones muy diferentes a las certificadas por el proveedor y sepamos esta contingencia demasiado tarde, lo cual ponía en riesgo los cálculos para los recuentos
- La falta de correlación entre el valor inoculado y el valor obtenido podría deberse a un efecto inhibitorio excepcional de las matrices empleadas (sinergia excelente de conservantes), que impide que los caldos neutralizantes hagan bien su trabajo. Se debería comprobar si realizando una dilución (-2) de la muestra (10 g en 90 ml y de aquí, tras 30 minutos, 10 ml en otro frasco de 90 ml) algunas de las matrices obtienen recuentos superiores a la dilución madre, como sucede en muchas matrices de alto poder inhibitorio intrínseco; y para las matrices donde esto suceda, variar el Protocolo para trabajar con ellas a partir de ahora a la dilución (-2) en vez de (o mejor: además de) a la (-1)
- PARA LA PROXIMA VALIDACION DE AHORRO DE TIEMPO EN LA LECTURA DE HONGOS (LEVADURAS Y MOHOS):
- Calcular para añadir 0,2 mL/placa en vez de 0,1, y así aumentamos el rango inferior
- Al ser las mismas matrices, nos ahorramos hacer la segunda dilución para el estudio del efecto matriz, ya sabemos que ninguna de estas matrices sigue inhibiendo tras su paso de 10 g en 90 mL de LPT Neutralizing Broth
- No hará falta inocular en los rangos altos más de 100 colonias/placa, ya que el rango más importante en micro cosmética es el bajo-muy bajo, y además los mohos no se cuentan bien a mayor concentración por placa
- Repartir los blancos de forma más aleatoria, para que no sean siempre de las mismas matrices
- Añadir cepas acompañantes/interferentes, ya que en el caso de los hongos sí que existen (bacterias): *Pseudomonas aeruginosa* como Gram negativo y *Staphylococcus hominis* como Gram positivo

ANEXO 3

Fotografías de la validación



Revitalización y diluciones decimales de las cepas



Neutralización de las muestras en la solución madre (-1)



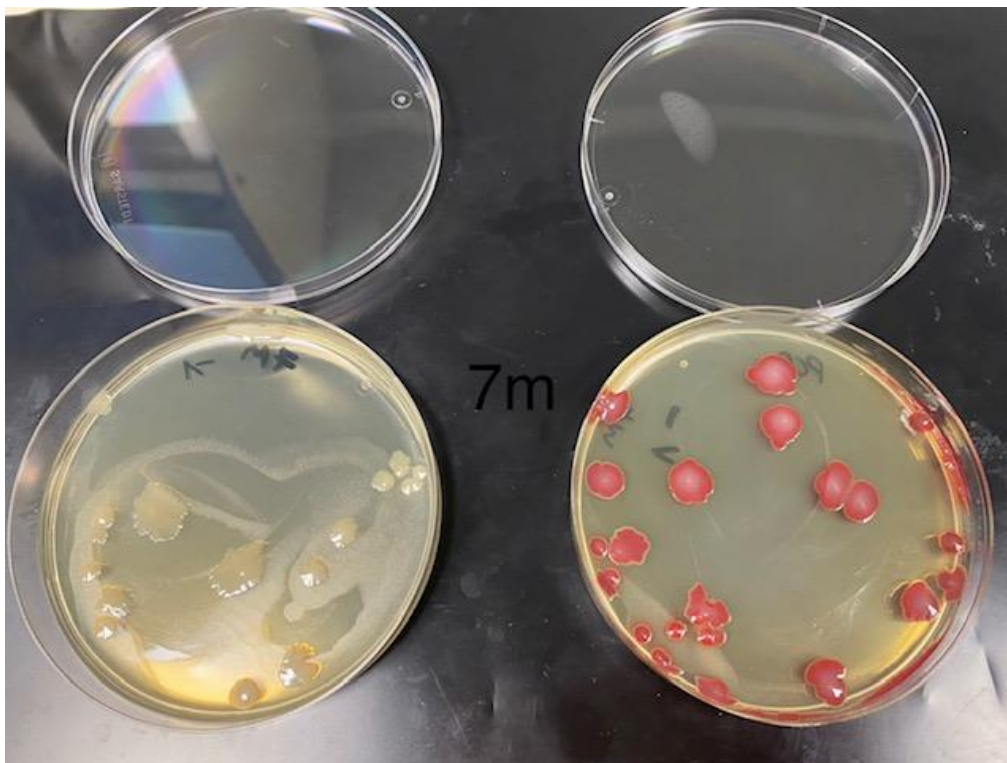
Inoculación de las cepas, a concentraciones precisas, en las muestras



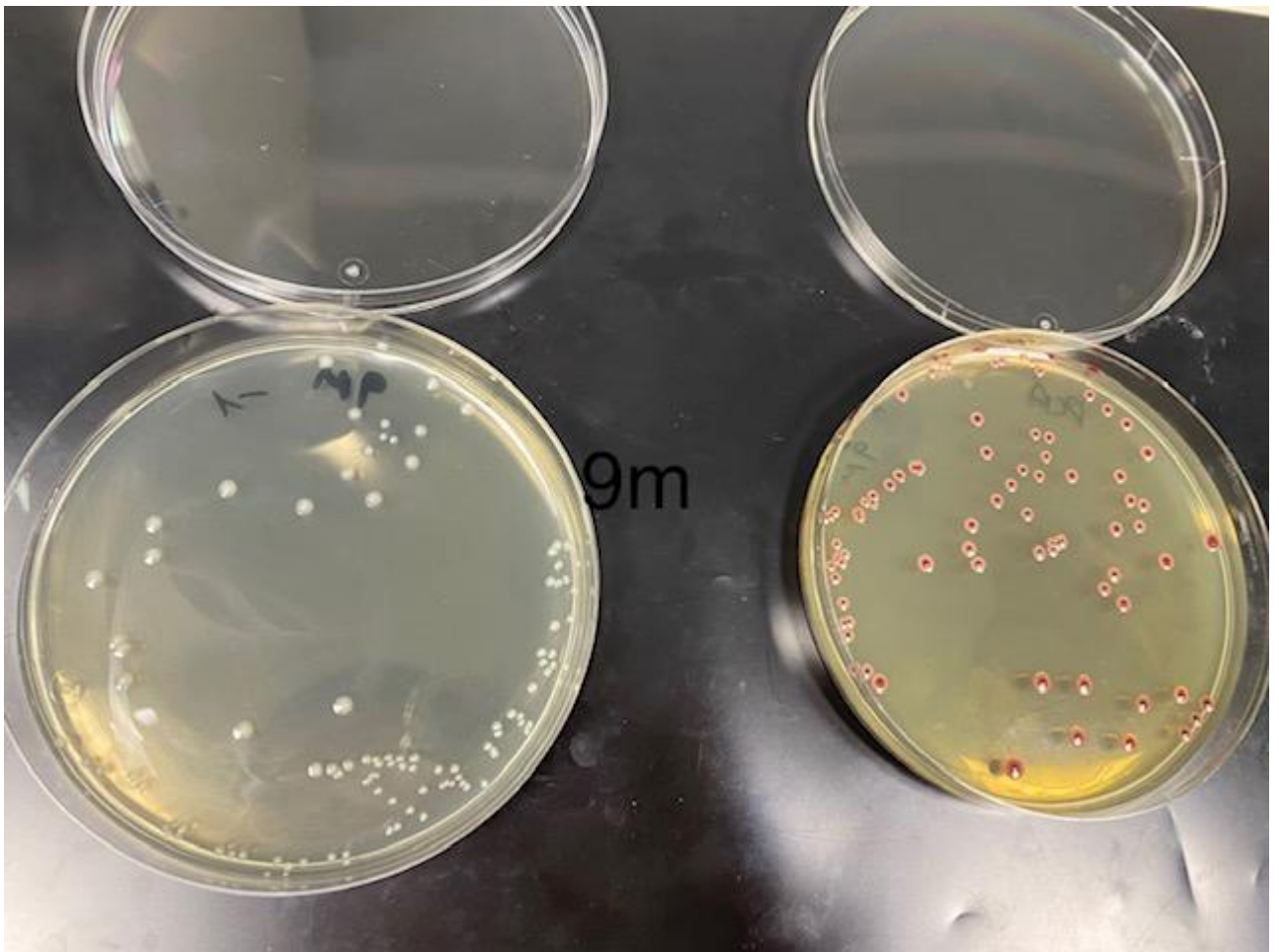
Inoculación de las muestras con microorganismos a concentraciones conocidas (0,1 mL) y siembra de las placas (extensión con asa Digrafsky)



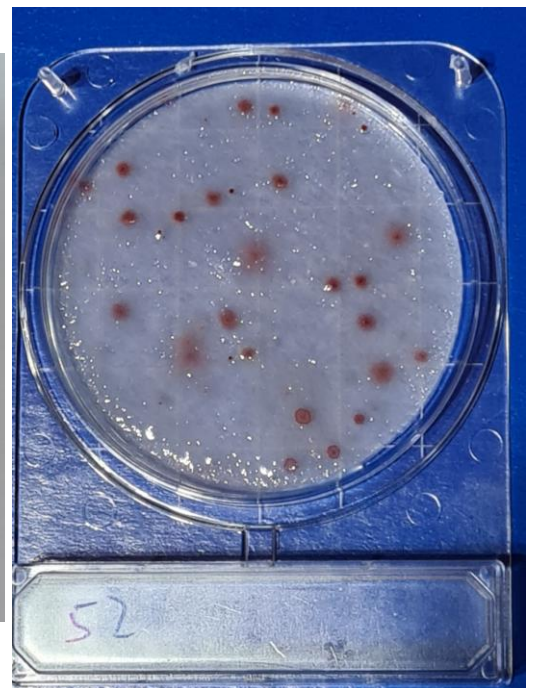
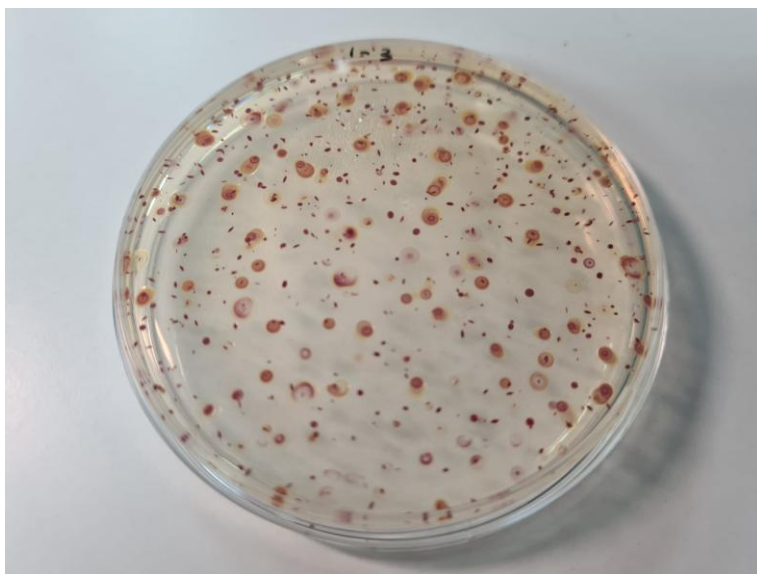
Incubación de las placas en estufa a 25°C



Lectura de las placas: *E.coli* en TSA y en PCA-cromogénico, inóculo teórico 25 ufc: 18 colonias en TSA y 25 exactas en PCA-crom, que se ven mucho mejor sin desgastar la vista y además mucho antes



Lectura de las placas: *Enterococcus faecalis* en TSA y en PCA-cromogénico, inóculo teórico 21 ufc.
 TSA, con claras colonias secundarias más pequeñas y apelotonadas en una zona marginal de la placa, que se descarta como aberrante. Reparto homogéneo en PCA-cromogénico



Recuento de Aerobios en PCA cromogénico (Maxim Rapid Agar) incluso en formato DryPlates (Dcha)

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO: Recuento de aerobios
 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 2-3 DIAS A 25°C, YA QUE 1-2 DIAS A 35°C NO APORTA MAYOR RAPIDEZ GLOBAL

cálculos acordes a vuestro recuento previo

FECHA: 07/02/2023

RANGO MEDIO

MATRICES	CEPAS [CONCENTRACIÓN CRECIENTE]	Volumen ufc/10g (= ufc/100 mL) calculadas	Col/Placa calculadas	RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS
1 M	O diana (Blanco 1)	Nada	0	0
2 M	Es 1 repe (Blanco 2)	Nada	0	0
3 M	E.coli	18mLT1 a Frasco 100ml =20 col/0,1 mL pl	20	20
4 M	Ps.aeruginosa	0,18mL T2 a Frasco100ml =20col/0,1 mLpl	20	20
5 M	Enterococcus faecalis	2,7mLT1 a Frasco 100ml =19 col/0,1 mL pl	19	19
6 M	Staphylococcus hominis	0,27mL T3 a Frasco100ml=19 col/0,1 mLpl	19	19
7 M	E.coli	20mLT1 a Frasco 100ml =25 col/0,1 mL pl	25	25
8 M	Ps.aeruginosa	0,2mL T2 a Frasco 100ml =25 col/0,1 mL pl	25	25
9 M	Enterococcus faecalis	3mLT1 a Frasco 100ml =24 col/0,1 mL pl	24	24
10 M	Staphylococcus hominis	0,3mL T3 a Frasco 100ml=24 col/0,1 mL pl	24	24
11 M	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,12 Ps + 0,18 St	29	29
12 M	Ps.aeruginosa	0,24mL T2 a Frasco100ml =30 col/0,1mLpl	30	30
13 M	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,12 Ps + 0,18 St	29	29
14 M	Staphylococcus hominis	0,36mL T3 a Frasco 100ml=29 col/0,1mLpl	29	29
15 M	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,14 Ps + 0,21 St	34	34
16 M	Ps.aeruginosa	0,28mL T2 a Frasco100ml =35 col/0,1mLpl	35	35
17 M	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,14 Ps + 0,21 St	34	34
18 M	Staphylococcus hominis	0,42mL T3 a Frasco 100ml=34 col/0,1mLpl	33	33
19 M	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,16 Ps + 0,24 St	39	39
20 M	Ps.aeruginosa	0,32mL T2 a Frasco100ml =40 col/0,1mLpl	40	40
21 M	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,16 Ps + 0,24 St	39	39
22 M	Staphylococcus hominis	0,48mL T3 a Frasco100ml=38 col/0,1 mLpl	38	38
23 M	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,18 Ps + 0,27 St	44	44
24 M	Ps.aeruginosa	0,36mL T2 a Frasco100ml =45 col/0,1mLpl	45	45
25 M	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,18 Ps + 0,27 St	44	44
26 M	Staphylococcus hominis	0,54mL T3 a Frasco100ml=44 col/0,1 mLpl	44	44
27 M	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,2 Ps + 0,3 St	49	49
28 M	Ps.aeruginosa	0,4mL T2 a Frasco 100ml =50 col/0,1 mL pl	50	50
29 M	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,2 Ps + 0,3 St	49	49
30 M	Staphylococcus hominis	0,6mL T3 a Frasco 100ml=49 col/0,1 mL pl	49	49

3/2 Jueves 19:00 3/2 Jueves 19:00 19/2 Jueves 19:00 19/2 Jueves 19:00

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO: Recuento de aerobio
 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: 2-3 DIAS A 25°C, YA QUE SE INCUBA A 35°C NO APORTA MAYOR RAPIDEZ GLOBAL
 cálculos acordes a vuestro recuento previo
 RANGO ALTO

MATRICES	CEPAS [CONCENTRACIÓN CRESCIENTE]	Volumen ufc/10g (= ufc/100 ml) calculadas	Col/Placa calculadas	RESULTADOS SEGUN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS
61 A	0 diana (Blanco 1)	Nada	0	48h TSA 48h CROMOKIT 48h TSA 72h 5d CROMOKIT 72h
62 A	E8 1 repe (Blanco 2)	Nada	0	0-1 TSA 0-2 CROMOKIT 0-2 TSA 72h 5d CROMOKIT 72h
63 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,29 Ps + 0,43 St	69	0 0 0 0 0 0
64 A	Ps.aeruginosa	0,58ml T2 a Frasco100ml=70 col/0,1mlpl	70	0 0 0 0 0 0
65 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,29 Ps + 0,43 St	69	0 0 0 0 0 0
66 A	Staphylococcus hominis	0,87ml T3 a Frasco 100ml=68 col/0,1mlpl	68	0 0 0 0 0 0
67 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,34 Ps + 0,5 St	84	0 0 0 0 0 0
68 A	Ps.aeruginosa	0,68ml T2 a Frasco100ml=85 col/0,1mlpl	85	0 0 0 0 0 0
69 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,34 Ps + 0,5 St	84	0 0 0 0 0 0
70 A	Staphylococcus hominis	1ml T3 a Frasco 100ml=83 col/0,1 ml pl	83	0 0 0 0 0 0
71 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,4 Ps + 0,06 St	99	0 0 0 0 0 0
72 A	Ps.aeruginosa	0,8ml T2 a Frasco100ml=100 col/0,1mlpl	100	0 0 0 0 0 0
73 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,4 Ps + 0,06 St	99	0 0 0 0 0 0
74 A	Staphylococcus hominis	0,12ml T2 a Frasco100ml=98 col/0,1 mlpl	98	0 0 0 0 0 0
75 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,5 Ps + 0,07 St	123	0 0 0 0 0 0
76 A	Ps.aeruginosa	1ml T2 a Frasco 100ml=125 col/0,1ml pl	125	0 0 0 0 0 0
77 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,5 Ps + 0,07 St	123	0 0 0 0 0 0
78 A	Staphylococcus hominis	0,15ml T2 a Frasco100ml=122 col/0,1mlpl	122	0 0 0 0 0 0
79 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,6 Ps + 0,09 St	148	0 0 0 0 0 0
80 A	Ps.aeruginosa	0,12ml T1 a Frasco100ml=150 col/0,1mlpl	150	0 0 0 0 0 0
81 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,6 Ps + 0,09 St	148	0 0 0 0 0 0
82 A	Staphylococcus hominis	0,18ml T2 a Frasco100ml=146col/0,1mlpl	146	0 0 0 0 0 0
83 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,7 Ps + 0,11 St	173	0 0 0 0 0 0
84 A	Ps.aeruginosa	0,14ml T1 a Frasco100ml=175col/0,1mlpl	175	0 0 0 0 0 0
85 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,7 Ps + 0,11 St	173	0 0 0 0 0 0
86 A	Staphylococcus hominis	0,21ml T2 a Frasco 100ml=174col/0,1mlpl	174	0 0 0 0 0 0
87 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,8 Ps + 0,12 St	198	0 0 0 0 0 0
88 A	Ps.aeruginosa	0,16ml T1 a Frasco100ml=200 col/0,1mlpl	200	0 0 0 0 0 0
89 A	1/2 Ps.aerug + 1/2 St.hominis	0,8 Ps + 0,12 St	198	0 0 0 0 0 0
90 A	Staphylococcus hominis	0,24ml T2 a Frasco100ml=196 col/0,1mlpl	196	0 0 0 0 0 0

9/2 jueves 19:00
 9/2 viernes 19:00
 10/2 viernes 19:00