

INFORME DE VALIDACIÓN CUANTITATIVA

RECUESTO DE *HONGOS (LEVADURAS Y MOHOS)* EN LABORATORIO COSMÉTICO MÉTODO RÁPIDO RAPID-YM AGAR FRENTE A MÉTODO CLÁSICO SABOURAUD

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

NOTA: MICROKIT se reserva el derecho de emplear los datos no confidenciales obtenidos en este estudio, para sus propios estudios de validación

1. Objetivos

Comprobar si el método de recuento de *Hongos (levaduras y Mohos)* a 35°C propuesto con Rapid.YM Agar de MICROKIT (Ref. deshidratado DMT243, Placas preparadas ECOPRYM) 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 (Sabouraud SDA con Caf y Gentamicina), tal y como sabemos lo hace fulminantemente por los estudios previos de MICROKIT. 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 *Hongos*, 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 Rapid YM Agar a 35°C es más rápido (2-3 días) que el SDA clásico a 25°C (5 días), con recuentos significativamente similares y como además, en la anterior validación del recuento de Aerobios, el medio propuesto PCA/TSA Cromogénico también fué más rápido (2-3 días) que el estándar (TSA) a 2 y 5 días con recuentos significativamente similares; entonces podremos ahorrar tiempo en la liberación de nuestros lotes, ya que los demás parámetros (patógenos) 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 *Hongos (Levaduras y Mohos)* reduciendo gracias al Rapid YM Agar de MICROKIT, el tiempo de incubación de 5 días a sólo 2-3 días. Los Hongos saprófitos que crecen 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 Hongos patógenos y saprófitos que crecen a 35°C son un indicador de la microbiota asociada al hombre, pero en este medio la mayoría de hongos que crecen a 25°C también crecen a 35°C (igual que los hongos fuera de medios de cultivo también crecen en verano), lo cual amplía el rango de especies fúngicas alterativas, lo que permite que los recuentos, además de más rápidos, sean más altos y por ello más cercanos a la realidad.

4. Diseño del experimento

Analizaremos con el método habitual empleado en este laboratorio (SDA con Caf y Gentamicina a 25°C), basado en la Norma ISO 16212, duplicado con el método rápido de MICROKIT (placas de Rapid YM Agar a 35°C), un número de muestras suficiente que, previamente, habremos contaminado con cantidades conocidas muy precisas de microorganismos diana, interferentes y acompañantes. 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 los 5 días en SDA y a los 2 y 3 días en el método rápido.

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/0,2 mL del frasco de 100 mL que se toman para extender en placa), 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. 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 (bacterias). Dado que ambos medios contienen 0,5 g/L de Cloranfenicol, no es esperable la aparición de colonias en las placas de bacterias, si bien es cierto que hay algunas bacterias resistentes al CAF. En el caso concreto de recuento de Hongos, elegiremos los Hongos más dispares: un moho bien conocido por todos a causa de los Challenge Test (*Aspergillus niger*), una levadura bien conocida por todos ya que la buscamos a diario en cosméticos (*Candida albicans*) y otra levadura salvaje (*Rhodotorula mucilaginosa*). Como bacterias posiblemente interferentes ante el CAF, elegimos como Gram positiva *Staphylococcus hominis* y como Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*. Y no sólo cepas de colección, también cepas nativas o salvajes de la zona geográfica donde se realice la validación: La *Rhodotorula mucilaginosa* y el *Staphylococcus hominis* lo son.

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 0,2 ml por placa en siembra en superficie, serían hasta 15 ufc/0,2ml 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/frasco. 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 colonias/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 Hongos 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.

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, el rango máximo podría subir; si formasen colonias muy grandes (ej. *Aspergillus niger*) 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 n° 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 Hongos, 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 Hongos, 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/acompañantes diferentes en el segundo. *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 28 de Febrero de 2023, los resultados se leen el 2, 3 y 6 de Marzo, el informe se acaba de redactar por parte de la empresa asesora MICROKIT, en su servicio del curso de validación, el día 8 de Marzo 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 - 1000 μ L y Micropipeta rango 10 - 100 μ L
- Puntas para micropipeta
- Agitador Vórtex
- Autoclave
- Estufa a 22,5 °C \pm 2,5°C y estufa a 32,5 \pm 0,5°C
- Nevera y su congelador
- Probetas estériles
- Botes de 100 ml estériles
- Alcohol de 70°
- Cabina de flujo laminar
- Balanza

5.2 Medios y diluentes utilizados

Medios y kits MICROKIT	Lote y caducidad
Agua marina al 0,9% solución isotónica 10 ml	2209/3950 6, 28-09-2024
Agua marina al 0,9% sol.isotónica 9 ml	2211/3972 6, 28-11-2024
LPT Neutralizing Broth en frascos 90 mL	2211/3973 6, 15-12-2024
SDA Caf+G en placas preparadas de 15 mL:	21660, 17/05/2023
Rapid YM Agar en placas preparadas de 25 mL:	2212/3981 6, 04-04-2023

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 CV% DEL LOTE	LOTE/CADUCIDAD
WDCM00053	<i>Aspergillus niger brasiliensis</i>	$(2,46 \pm 1,64) \times 10^5$ en SDA	41,98% en SDA	13-05-2023
WDCM00054	<i>Candida albicans</i>	$(1,64 \pm 0,54) \times 10^7$ en PDA	23,35% en SDA	7-10-2023
MKTM-R001	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	$(2,38 \pm 1,52) \times 10^7$ en SDA	37,81% en SDA	24-10-24
WDCM00025	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$(2,5 \pm 0,8) \times 10^7$ en TSA	17,34% 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?:

Aspergillus niger como representante de los mohos, es sin duda el más conocido en el sector cosmético, por su uso en Challenge test. Sus colonias, blanquecinas o amarillentas, se vuelven negras pasado el tiempo necesario para que esporulen.

Candida albicans, como representante de las levaduras, es también la levadura más conocida del sector cosmético, ya que se busca activamente su ausencia en cada lote.

Rhodotorula mucilaginosa es una levadura ambiental inocua, muy común, característica por crecer incluso en paredes y duchas con sus colonias de color asalmonado-rojizo.

Pseudomonas aeruginosa como representante de las bacterias Gram negativas oxidasa positivas, a veces consigue crecer en medios con cloranfenicol, por lo que aparte de un buen acompañante, puede ser un excelente interferente

Staphylococcus aureus como representante de las bacterias Gram positivas, es probable que tenga la capacidad de crecer en medios con cloranfenicol, por lo que es candidato a ser acompañante y a su vez, interferente

5.4 Matrices empleadas

Muestra	Matriz	Muestra	Matriz
1, 31, 61	GEL CONTORNO DE OJOS	16, 46, 76	GEL ALOE
2, 32, 62	LOCION CORPORAL BEBÉ	17, 47, 77	CREMA GEL ACNÉ
3, 33, 63	GEL HIGIENE INTIMA	18, 48, 78	SERUM HIDRATANTE
4, 34, 64	AMPOLLAS ANTIEDAD PEELING	19, 49, 79	TONICO LIMPIADOR
5, 35, 65	PROTECTOR SOLAR TACTO SEDA	20, 50, 80	CREMA FACIAL HIDRATANTE
6, 36, 66	PROTECTOR SOLAR TACTO SECO	21, 51, 81	CREMA GEL EXFOLIANTE
7, 37, 67	PROTECTOR SOLAR FLUIDO LIGERO	22, 52, 82	MASCARA FACIAL REAFIRMANTE
8, 38, 68	LECHE CORPORAL HIDRATANTE	23, 53, 83	BALSAMO LABIAL
9, 39, 69	SERUM ANTIENVEJECIMIENTO PIEL	24, 54, 84	PROTECTOR SOLAR FACIAL INFANTIL 50
10, 40, 70	SERUM LIPOSOMAL CON VITAMINAS	25, 55, 85	EXTRACTO GINKGO BILOBA
11, 41, 71	GEL LIMPIADOR Y DESMAQUILLANTE	26, 56, 86	EXTRACTO CAMOMILA
12, 42, 72	CREMA ESPUMOSA SIN JABÓN	27, 57, 87	ACIDO FERULICO ANTIOXIDANTE
13, 43, 73	AGUA LIPOSOMAL DESMAQUILLANTE	28, 58, 88	NIACINAMIDA REDUCCIÓN ACNÉ
14, 44, 74	CREMA EXFOLIANTE	29, 59, 89	LIMPIADOR LIPOSOMAL AC. LAURICO
15, 45, 75	FLUIDO FACIAL ANTIOXIDANTE	30, 60, 90	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 plaquear y conocer la concentración inicial de Hongos 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 Rapid YM Agar con respecto al medio clásico SDA (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.
- Recordamos que los mohos flotan de forma casi instantánea, lo que obliga durante todo el experimento a agitar inmediatamente antes de cada dilución y de cada siembra en placa.
- 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.
- Si esta validación fuese para el recuento de un diana concreto, 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>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Rhodototula mucilaginoso</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
Bajo	1-9	1-9	1-9	<15	<15
Medio	10-18	10-18	10-18	20-50	20-50
Alto	18-90	18-90	18-90	70-200	68-200

Los valores deseados de los hongos en cada rango son muy inferiores a los de las bacterias, dado su muy superior tamaño celular y colonial

- 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 SDA por siembra en superficie de 0,2 mL y extensión con asa Digrafsky y otros dos en Rapid YM Agar también por siembra en superficie de 0,2 mL y extensión con asa Digrafsky. Ambos medios se incuban (introduciéndolas a la vez en cada estufa) a 20-25°C durante 5 días para el Sabouraud, y a 30-35°C durante 2 y 3 días para el Rapid YM Agar.
- Transcurrido el tiempo de incubación se hace el recuento 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).

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 SDA	Rto. en placa Rapid YM Agar
			5 días	2 días 3 días
WDCM00053	<i>Aspergillus niger</i>	20 ufc/0,1 mL	INCONTABLES	82/80 col 102/88col
WDCM00054	<i>Candida albicans</i>	18 ufc/0,1 mL	280/384 col	312/228 col 312/237 col
MKTM-R001	<i>Rhodototula mucilaginoso</i>	18 ufc/0,1 mL	376/360 col	448/172 col 450/208 col

Debió haber un error en el cálculo de los negros, por lo que habremos de fiarnos exclusivamente del valor certificado pero sobre todo, del comparado entre ambos medios, que sí ha resultado coherente. Cuando el recuento de los negros resulta significativamente diferente del valor certificado de las cepas, como ha sucedido (por ejemplo, la siembra en masa o por filtración suelen bajar respectivamente 1 log y un 30% la concentración certificada; pero subir, como sucede aquí, no es nada común), 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, TAL Y COMO HA SUCEDIDO. Se concluye, entonces, al comparar con los resultados de las muestras, que las lentículas se mantienen con un recuento y una variabilidad perfectos (en el mismo log) respecto al certificado en origen por el proveedor, y que los valores estimados de los negros definitivamente fueron mal calculados. Pero como esta validación sólo pretende comparar resultados y rapidez entre ambos medios (SDA y Rapid YM Agar), realmente nos da igual el resultado de los negros. 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. Y nos basaremos en los excelentes 540 resultados de las muestras, mucho más significativos que estos 18 resultados de los negros, para mantener el rigor del trabajo. Los negros sólo sirven para saber si las cepas están a la concentración certificada; y si no lo hemos conseguido demostrar aquí, pero sí en 540 resultados, sería absurdo cuestionar el experimento por mera ortodoxia.

7. Resultados

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

Muestra	Cepa	Valor inóculo teórico	SDA Caf+G 5 días	Rapid YM Agar 2 días	Rapid YM Agar 3 días
1	Aspergillus	1 *	4, 3	1, 6	2, 8
2	Candida	1 *	9, 12	9, 6	9, 9
3	Rhodotorula	1 *	10, 10	12, 14	15, 15
4	Aspergillus	2 *	25, 24	0, 0	0, 0
5	Candida	2 *	1, 2	18, 18	19, 22
6	Rhodotorula	2 *	10, 11	1, 1	1, 1
7	Aspergillus	3	13, 10	13, 10	13, 10
8	Candida	3	1, 3	3, 4	3, 5
9	Rhodotorula	3	3, 3	2, 3	2, 3
10	Aspergillus	4	14, 11	15, 15	15, 15
11	Candida	4	3, 1	3, 3	4, 3
12	Rhodotorula	4	5, 5	2, 3	2, 3
13	Aspergillus	5	18, 18	14, 19	16, 21
14	Candida	5	4, 5	7, 6	8, 6
15	Rhodotorula	5	3, 4	6, 7	7, 10
16	Aspergillus	6	12, 20	20, 21	21, 20
17	Candida	6	3, 6	2, 6	2, 9
18	Rhodotorula	6	9, 8	10, 4	11, 4
19	Aspergillus	7	22, 15	20, 19	19, 20
20	Candida	7	8, 3	7, 10	7, 10
21	Rhodotorula	7 *	1, 0	0, 0	0, 0
22	Aspergillus	8	30, 28	28, 23	29, 26
23	Candida	8	5, 16	6, 8	6, 8
24	Rhodotorula	8	11, 16	9, 16	9, 17
25	Aspergillus	9	24, 12	20, 21	23, 26
26	Candida	9	16, 7	3, 7	3, 8
27	Rhodotorula	9	5, 6	6, 3	7, 4
28	Pseudomonas	(18)	0, 0	0, 0	0, 0
29	Staphylococcus	(15)	0, 0	0, 0	0, 0
30	Pseud + Staph	(33) *	168, 200	96, 106	146, 116
Σ ambas placas hongos			406	404	435
Comparativa total				99,51% del SDA en 5 días, prácticamente idéntico	107,14% más que el SDA en 5 días y 107,67% más que Rapid YM en 2 días

*En las muestras 1-6 la incertidumbre se dispara, al haber inóculos mínimos, por lo que, habiendo obtenido esos resultados tan dispares, debemos descartarlas como aberrantes y no tenerlas presentes en los cálculos

* algo raro sucedió, ya que la linealidad en las demás muestras va muy bien: descartada por aberrante muestra 21

* Deben hacer sinergia en la resistencia contra el CAF ambas bacterias juntas: descartado por aberrante blanco 30

Hemos buscado en el rango bajo obtener recuentos MUY bajos, como corresponde a la mayoría de muestras en microbiología cosmética.

Los resultados en color rojo se descartan como aberrantes, claros fallos en la incertidumbre de la distribución homogénea de las cepas en la muestra, en la dispensación de inóculos o en la inhibición de la matriz, al no seguir la linealidad de las demás muestras/inóculos, o al ser Incontables, al haber en la placa doble o nulo inóculo, u otras vicisitudes de la casuística

48 resultados descartados de Rango BAJO de los 180 totales (27%)

En la tabla de recuento bajo es donde más debemos fijarnos, ya que en el día a día son los recuentos más habituales: 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 0,2 mL de los 100 mL resultantes (=0,02 g), si hubiera 1000 ufc/g obtendríamos 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, **a igualdad de inóculos, el Rapid YM Agar obtiene en sólo 2 días el 99,5% de las colonias que el SDA en 5 días.** Y en sólo 3 días, obtiene el 108% de las colonias que el SDA en 5 días. De modo que ambos tiempos de incubación del Rapid YM son equivalentes al método clásico de 5 días en SDA, no hace falta esperar 5 días en el recuento de hongos con SDA, ni siquiera 3 días con Rapid YM, y con 2 días es suficiente, ya que **en microbiología se acepta que recuperaciones superiores al 95% en los recuentos, equivalen al 100%.**

Por lo que perfectamente ya lo podemos 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.

Otras observaciones de la casuística:

Curiosa demostración de la sinergia entre una bacteria Gram positiva y una Gram negativa, para juntas, combatir la presencia de Cloranfenicol y hacerse viables. Cuando por separado, queda claro que no crecen en estos medios con CAF y las muestras donde las inoculamos por separado, sirven de blancos sin hongos.

7.2 Rango **MEDIO** (placas duplicadas de la dilución madre (-1))

Muestra	Cepa	Valor inóculo teórico	SDA Caf+G 5 días	Rapid YM Agar 2 días	Rapid YM Agar 3 días
31	Aspergillus	10	24, 20	17, 30	23, 32
32	Candida	10	8, 8	4, 12	5, 12
33	Rhodotorula	10	8, 12	9, 9	10, 9
34	Pseudomonas	(38)	0, 0	1, 1	1, 1
35	Staphylococcus	(30)	0, 0	1, 1	1, 1
36	Pseud + Staph	(68)	0, 0	1, 1	1, 1
37	Aspergillus	11	30, 25	36, 30	38, 40
38	Candida	11	4, 9	7, 4	10, 4
39	Rhodotorula	11	16, 13	1, 11	12, 12
40	Aspergillus	12	31, 23	27, 34	32, 35
41	Candida	12	12, 6	13, 6	13, 6
42	Rhodotorula	12	13, 13	13, 17	13, 19
43	Aspergillus	13	25, 24	24, 27	26, 33
44	Candida	13	8, 16	6, 13	6, 13
45	Rhodotorula	13	11, 18	13, 13	13, 13
46	Aspergillus	14	32, 30	35, 28	37, 28
47	Candida	14	7, 10	10, 10	11, 10
48	Rhodotorula	14	13, 19	17, 16	19, 16
49	Aspergillus	15	28, 27	35, 38	40, 44
50	Candida	15	16, 10	15, 18	15, 18
51	Rhodotorula	15 *	3, 1	0, 0	0, 0
52	Aspergillus	16	30, 37	27, 45	34, 53
53	Candida	16	15, 11	21, 14	24, 16
54	Rhodotorula	16	32, 22	30, 23	35, 26
55	Aspergillus	17	30, 36	45, 37	46, 41
56	Candida	17	15, 18	11, 15	13, 16
57	Rhodotorula	17	14, 13	7, 10	7, 12
58	Aspergillus	18	19, 14	36, 28	37, 30
59	Candida	18	21, 19	22, 23	23, 17
60	Rhodotorula	18 *	292, 240	384, 432	393, 460
Σ ambas placas hongos			915	992	1.097
Comparativa total				108,42 % por encima del SDA en 5 días,	119,89 % más que el SDA en 5 días y 110,58 % más que Rapid YM en 2 días

NOTA: Hemos buscado un valor medio de 14 col/placa en vez del típico de 50 porque en microbiología cosmética importan más los rangos bajos, a causa de los valores límite Normativos, además en hongos-mohos resulta difícil contar 50 col/placa

* algo raro sucedió, ya que la linealidad en las demás muestras va muy bien: descartada por aberrante muestra 51

* La muestra 60 debe descartarse como aberrante, ya que sus recuentos pierden la linealidad y se disparan

Los resultados en color rojo se descartan como aberrantes, claros fallos en la incertidumbre de la distribución homogénea de las cepas en la muestra, en la dispensación de inóculos o en la inhibición de la matriz, al no seguir la linealidad de las demás muestras/inóculos, o al ser Incontables, al haber en la placa doble o nulo inóculo, u otras vicisitudes de la casuística

24 resultados descartados de Rango MEDIO de los 180 totales (13,5%)

En la tabla de recuento medio es donde más coherentes suelen ser los resultados, por la reducción de la incertidumbre. Hemos creado conscientemente unos recuentos medios muy bajos, a causa, como ya explicamos en el texto del rango bajo, de la idiosincrasia de la microbiología cosmética y su Normativa, que habla de <1.000 ufc/g, y al diluir 10 g de muestra en 90 mL de LPT Neutralizing Broth (-1) y tomar por cada placa 0,2 mL de los 100 mL resultantes (=0,02 g), si hubiera 1000 ufc/g obtendríamos 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 en este rango medio, **a igualdad de inóculos, el Rapid YM Agar obtiene en sólo 2 días más colonias (108%) que el SDA en 5 días.** Casi un 10% más de colonias. Y en sólo 3 días, obtiene el 120% de las colonias que el SDA en 5 días, lo cual ya es una diferencia muy significativa (20% superior). De modo que ambos tiempos de incubación del Rapid YM son equivalentes al método clásico de 5 días en SDA, no hace falta esperar 5 días en el recuento de hongos con SDA, ni siquiera 3 días con Rapid YM, y con 2 días es suficiente, ya que **en microbiología se acepta que recuperaciones superiores al 95% en los recuentos, equivalen al 100%.**, y en este caso no sólo superamos ese 95% sino que incluso aumentamos en un 8% el número de colonias detectadas.

Por lo que perfectamente ya lo podemos sustituir sin necesidad de observar lo que ocurre en el rango alto, que es el menos significativos en microbiología cosmética a causa de los máximos normativos arriba indicados.

Otras observaciones de la casuística:

La muestra 51 inhibe la Rhodotorula (o bien ha habido un fallo en su dispensación en las 6 placas, lo cual es más difícil de imaginar). Además observamos que es la misma matriz de la muestra 21 del rango bajo, donde sucedió lo mismo, por lo que podemos concluir que esa matriz inhibe la Rhodotorula.

La muestra 60, también descartada como aberrante, porque dispara los recuentos fuera de su linealidad, lo mismo que la 30 del rango bajo (misma matriz), aunque en ese caso disparó a las bacterias ¿neutralizó el CAF?

El crecimiento reiterado de una colonia en cada placa de Rapid YM agar en los blancos con bacterias (muestras 34, 35 y 36) resulta difícilmente explicable, ya que el medio Rapid YM lleva exactamente la misma proporción de Cloranfenicol que el Sabouraud. Y es raro que el azar permita entrar exactamente a 1 sola colonia de hongo ambiental en cada una de esas 6 placas. Pero lógicamente las placas se tiraron al contenedor de residuos y ya no podemos verificar si se trataba de bacterias o de hongos, de modo que nos conformaremos con dar esos blancos como aberrantes, sin mayor trascendencia. Además esta situación no se repite en los blancos de los otros 2 rangos.

7.3 Rango **ALTO** (placas duplicadas de la dilución madre (-1))

Muestra	Cepa	Valor inóculo teórico	SDA Caf+G 5 días	Rapid YM Agar 2 días	Rapid YM Agar 3 días
61	Aspergillus	20	17, 20	49, 55	49, 55
62	Candida	20	17, 12	8, 19	9, 22
63	Rhodotorula	20	5, 14	26, 29	27, 29
64	Aspergillus	22 *	0, 0	0, 0	0, 0
65	Candida	22	6, 15	9, 14	9, 15
66	Rhodotorula	22	23, 18	18, 17	18, 17
67	Aspergillus	24	32, 29	49, 42	49, 43
68	Candida	24	21, 16	16, 23	18, 26
69	Rhodotorula	24	24, 37	20, 17	20, 20
70	Aspergillus	26	34, 38	41, 54	44, 64
71	Candida	26	21, 13	23, 21	27, 24
72	Rhodotorula	26	28, 22	29, 14	31, 18
73	Aspergillus	28	46, 38	55, 61	55, 64
74	Candida	28	12, 24	14, 16	16, 23
75	Rhodotorula	28	21, 24	20, 18	28, 18
76	Pseudomonas	(54)	0, 0	0, 0	0, 0
77	Staphylococcus	(45)	0, 0	0, 0	0, 0
78	Pseud + Staph	(99)	0, 0	0, 0	0, 0
79	Aspergillus	30	42, 40	72, 76	80, 76
80	Candida	30	32, 22	23, 21	26, 24
81	Rhodotorula	30 *	1, 1	0, 0	0, 0
82	Aspergillus	40	37, 44	88, 74	88, 74
83	Candida	40	15, 21	21, 25	31, 36
84	Rhodotorula	40	62, 48	44, 56	63, 60
85	Aspergillus	50	34, 38	46, 98	46, 103
86	Candida	50	30, 27	26, 36	36, 36
87	Rhodotorula	50	17, 22	36, 13	36, 18
88	Aspergillus	90	42, 46	94, 90	94, 102
89	Candida	90	32, 63	50, 60	50, 76
90	Rhodotorula	90 *	Incontables (masa asalmonada)	Incontables (masa asalmonada)	Incontables (masa asalmonada)
Σ ambas placas hongos			1.341	1.826	2.003
Comparativa total				136,17 % por encima del SDA en 5 días	149,37% más que el SDA en 5 días y 109,69% más que Rapid YM en 2 días

NOTA: Hemos buscado un valor medio de 25-30 colonias/placa en vez del típico de 100 porque en microbiología cosmética importan más los rangos bajos, además en hongos-mohos resulta difícil contar 100/placa

* La muestra 64 debe descartarse como aberrante, ya que sus recuentos se hacen nulos, debe inhibir al Aspergillus

* algo raro sucedió, ya que la linealidad en las demás muestras va muy bien: descartada por aberrante muestra 81

* Descartada por placas incontables la muestra 90

Los resultados en color rojo se descartan como aberrantes, claros fallos en la incertidumbre de la distribución homogénea de las cepas en la muestra, en la dispensación de inóculos o en la inhibición de la matriz, al no seguir la linealidad de las demás muestras/inóculos, o al ser Incontables, al haber en la placa doble o nulo inóculo, u otras vicisitudes de la casuística

18 resultados descartados de Rango ALTO de los 180 totales (10%)

Hemos creado conscientemente unos recuentos medios muy bajos, a causa, como ya explicamos en el texto de Los anteriores rangos, de la idiosincrasia de la microbiología cosmética y su Normativa, que habla de <1.000 ufc/g, y al diluir 10 g de muestra en 90 mL de LPT Neutralizing Broth (-1) y tomar por cada placa 0,2 mL de los 100 mL resultantes (=0,02 g), si hubiera 1000 ufc/g obtendríamos 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 en este rango alto, **a igualdad de inóculos, el Rapid YM Agar obtiene en sólo 2 días más colonias (136%) que el SDA en 5 días.** ¡Un 36% más de colonias! Y en sólo 3 días, obtiene el 149% de las colonias que el SDA en 5 días, lo cual ya es una diferencia muy significativa (49% superior). De modo que ambos tiempos de incubación del Rapid YM son equivalentes al método clásico de 5 días en SDA, no hace falta esperar 5 días en el recuento de hongos con SDA, ni siquiera 3 días con Rapid YM, y con 2 días es suficiente, ya que **en microbiología se acepta que recuperaciones superiores al 95% en los recuentos, equivalen al 100%.**, y en este caso no sólo superamos ese 95% sino que incluso aumentamos en un 36% el número de colonias detectadas.

Por lo que a la vista de estos resultados, perfectamente ya podemos tomar la sensata decisión de sustituir el Sabouraud por Rapid YM Agar sin siquiera necesidad de haber hecho el estudio de los parámetros típicos de una validación cuantitativa, que haremos a continuación.

Otras observaciones de la casuística:

La muestra 64 ha inhibido al Aspergillus, como vimos que sucedió en la misma matriz en la muestra 4 del rango bajo en Rapid YM: En la otra muestra de la misma matriz, la muestra 34, del rango medio, no podemos saberlo porque actuó como blanco, pero imaginamos hubiera ocurrido lo mismo.

La muestra 81 inhibe la Rhodotorula. Además es la misma matriz de la muestra 21 del rango bajo y 51 del rango medio, donde sucedió lo mismo, por lo que ya sabemos a ciencia cierta que esa matriz inhibe la Rhodotorula. Dato que tampoco aporta interés especial, al ser una levadura inocua.

La muestra 90, también descartada como aberrante, porque dispara los recuentos fuera de su linealidad, lo mismo que la 60 del rango medio y la 30 del rango bajo (misma matriz), aunque en este último caso disparó a las bacterias ¿neutralizó el CAF?

El crecimiento reiterado de una colonia en cada placa de Rapid YM agar en los blancos con bacterias del rango medio (muestras 34, 35 y 36) no se repite en el rango alto ni sucedió en el rango bajo, ya que el medio Rapid YM lleva exactamente la misma proporción de Cloranfenicol que el Sabouraud. De modo que nos conformaremos con imaginar que esos blancos del rango medio fueron aberrantes, sin mayor trascendencia.

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). Y conociendo bien la microbiología, la estadística bien aplicada no requiere de simples tests que no tienen en cuenta gran parte de la idiosincrasia de la microbiología.
- 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 *Hongos*, 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 Hongos, ya que cualquier microorganismo es diana.
- **Robustez del parámetro:** Denominamos así la capacidad del parámetro *Recuento de Hongos* 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 *Hongos* 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 90 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 inoculo de cepas patrón. Pero lo que realmente importa en esta validación es calcular la recuperación absoluta (comparando el recuento y el tiempo en SDA 5 días a 25°C, con los de Rapid YM Agar incubado 2-3 días a 35°C, que es el medio que queremos validar porque ha demostrado ser mucho más rápido que el SDA, SDA Caf o SDA Caf+G, 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 Rapid YM Agar con respecto a cepas diana de concentración calculada, sino lo bien o mejor que recupera el Rapid YM Agar respecto al SDA estándar y sobre todo, la rapidez en la obtención de sus resultados con respecto al SDA, 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 bacterias aerobias, que ya hemos validado que se consigue en sólo 48h gracias al cambio de TSA a PCA cromogénico de MICROKIT.

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 Rapid YM Agar de MICROKIT con respecto al SDA estándar.

Exactitud absoluta entre el Rapid YM Agar 2 días a 35°C y el SDA 5 días a 25°C

Rango de Medida	Recuento en Rapid YM Agar 2 días	Recuento en SDA 5 días	Recuento Rapid YM Agar /SDA
BAJO	404 colonias/60 placas	406 colonias/60 placas	99,51 %
MEDIO	992 colonias/60 placas	915 colonias/60 placas	108,42 %
ALTO	1.826 colonias/60 placas	1.341 colonias/60 placas	136,17 %
Exactitud absoluta media			114,7 %

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

Exactitud absoluta entre el Rapid YM Agar 3 días a 35°C y el SDA 5 días a 25°C

Rango de Medida	Recuento en Rapid YM Agar 3 días	Recuento en SDA 5 días	Recuento Rapid YM Agar /SDA
BAJO	435 colonias/60 placas	406 colonias/60 placas	104,14 %
MEDIO	1.097 colonias/60 placas	915 colonias/60 placas	119,89 %
ALTO	2.003 colonias/60 placas	1.341 colonias/60 placas	149,37 %
Exactitud absoluta media			124,47 %

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

Otras conclusiones interesantes:

El Rapid YM Agar obtiene resultados muy similares cuando se incubaba a 35°C en 2 y en 3 días (48 h y 72 h)

Rango de Medida	Recuento en Rapid YM Agar 2 días	Recuento en Rapid YM Agar 3 días	Recuento 2/3 días
BAJO	404 colonias/60 placas	435 colonias/60 placas	92,87 %
MEDIO	992 colonias/60 placas	1.097 colonias/60 placas	90,43 %
ALTO	1.826 colonias/60 placas	2.003 colonias/60 placas	91,16 %
Exactitud absoluta media			91,49 % (>90%)

De modo que podemos reducir el tiempo de incubación de Hongos, incluyendo los alterativos en verano y asociados al hombre, (saprófitos a 35°C), de 5 días a sólo 2!!!

La conclusión es clara: podemos trabajar con plena confianza con Rapid YM Agar y ahorrar 2 ó incluso, si nos conviene (leer las placas de recuento de aerobios y de hongos el mismo día), 3 días de incubación. Por tanto, el recuento de Hongos deja de ser uno de los 2 hándicaps que nos obligaban hasta ahora a retener el producto final durante 5 días. Como ya resolvimos el otro hándicap, cuando validamos el PCA cromogénico para recuento total de aerobios en 48h (sean aerobios asociados al hombre o alterativos en verano, a 35°C, sean aerobios alterativos en las temperaturas de almacenamiento de primavera-otoño a 25°C); la cuarentena de stock de producto terminado la pasan a marcar desde ahora los patógenos lentos (sobre todo *Staphylococcus aureus*, con sus 3-4 días entre enriquecimiento + 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 Hongos 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 “Hongos”, 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

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. Los resultados de SDA a 5 días y de Rapid YM Agar a 2 días:

RANGO BAJO	SDA 5 días			Rapid YM Agar 2 días		
Muestra	Datos, Media	Sm	CV% Sm/Media	Datos, Media	Sm	CV% SM/Media
1	4, 3 3,5	0,71	20,29 %	1, 6 3,5	3,54	101,14 %
2	9, 12 10,5	2,12	20,19 %	9, 6 7,5	2,12	28,27 %
3	10, 10 10	0	0 %	12, 14 13	1,41	10,85 %
4	25, 24 24,5	0,71	2,90 %	0, 0 0	0	-
5	1, 2 1,5	0,71	47,33 %	18, 18 18	0	0 %
6	10, 11 10,5	0,71	6,76 %	1, 1 1	0	0 %
7	13, 10 11,5	2,12	18,43 %	13, 10 11,5	2,12	18,43 %
8	1, 3 2	1,41	70,5 %	3, 4 3,5	0,71	20,29 %
9	3, 3 3	0	0 %	2, 3 2,5	0,71	28,4 %
10	14, 11 12,5	2,12	16,96 %	15, 15 15	0	0 %
11	3, 1 2	1,41	70,5 %	3, 3 3	0	0 %
12	5, 5 5	0	0 %	2, 3 2,5	0,71	28,4 %
13	18, 18 18	0	0 %	14, 19 16,5	3,54	21,27 %
14	4, 5 4,5	0,71	15,78 %	7, 6 6,5	0,71	10,92 %
15	3, 4 3,5	0,71	20,29 %	6, 7 6,5	0,71	10,92 %
16	12, 20 16	5,66	35,37 %	20, 21 20,5	0,71	3,46 %
17	3, 6 4,5	2,12	47,11 %	2, 6 4	2,83	70,75 %
18	9, 8 8,5	0,71	8,35 %	10, 4 7	4,24	60,57 %
19	22, 15 18,5	4,95	26,76 %	20, 19 19,5	0,71	3,64 %
20	8, 3 5,5	3,54	64,36 %	7, 10 8,5	2,12	24,94 %
21	1, 0 0,5	0,71	142 %	0, 0 0	0	-
22	30, 28 29	1,41	4,86 %	28, 23 25,5	3,54	13,88 %
23	5, 16 10,5	7,78	74,10 %	6, 8 7	1,41	20,14 %
24	11, 16 13,5	3,54	26,22 %	9, 16 12,5	4,95	39,6 %
25	24, 12 18	8,49	47,17 %	20, 21 20,5	0,71	3,46 %
26	16, 7 11,5	6,36	55,30 %	3, 7 5	2,83	56,6 %
27	5, 6 5,5	0,71	12,91 %	6, 3 4,5	2,12	47,11 %
28	0, 0 0	0	-	0, 0 0	0	-
29	0, 0 0	0	-	0, 0 0	0	-
30	-/- -	-	-	-/-	-	-
TOTAL	406	-	31,65%	404	-	24,92 %

En ambos casos los medidores de la precisión están dentro de los rangos más estrictos, sobre todo en el caso del Rapid YM Agar (por debajo de CV 25%)

RANGO MEDIO	SDA 5 días			Rapid YM Agar 2 días		
Muestra	Datos, Media	Sm	CV% Sm/Media	Datos, Media	Sm	CV% SM/Media
31	24, 20 22	2,83	12,86 %	17, 30 23,5	9,19	39,11 %
32	8, 8 8	0	0 %	4, 12 8	5,66	70,75 %
33	8, 12 10	2,83	28,3 %	9, 9 9	0	0 %
34	0, 0 0	0	-	1, 1 1	0	0 %
35	0, 0 0	0	-	1, 1 1	0	0 %
36	0, 0 0	0	-	1, 1 1	0	0 %
37	30, 25 27,5	3,54	12,87 %	36, 30 33	4,24	12,85 %
38	4, 9 6,5	3,54	54,46 %	7, 4 5,5	2,12	38,55 %
39	16, 13 14,5	2,12	14,62 %	1, 11 6	7,07	117,83 %
40	31, 23 27	5,66	20,96 %	27, 34 30,5	4,95	16,23 %
41	12, 6 9	4,24	47,11 %	13, 6 9,5	4,95	52,1 %
42	13, 13 13	0	0 %	13, 17 15	2,83	18,87 %
43	25, 24 24,5	0,71	2,9 %	24, 27 25,5	2,12	8,31 %
44	8, 16 12	5,66	47,17 %	6, 13 9,5	4,95	52,1 %
45	11, 18 14,5	4,95	34,14 %	13, 13 13	0	0 %
46	32, 30 31	1,41	4,55 %	35, 28 31,5	4,95	15,71 %
47	7, 10 8,5	2,12	24,94 %	10, 10 10	0	0 %
48	13, 19 16	4,24	26,5 %	17, 16 16,5	0,71	4,3 %
49	28, 27 27,5	0,71	2,58 %	35, 38 36,5	2,12	5,81 %
50	16, 10 13	4,24	32,61 %	15, 18 16,5	2,12	12,85 %
51	3, 1 2	1,41	70,5 %	0, 0 0	0	-
52	30, 37 33,5	4,95	14,78 %	27, 45 36	12,73	35,36 %
53	15, 11 13	2,83	21,77 %	21, 14 17,5	4,95	28,29 %
54	32, 22 27	7,07	26,19 %	30, 23 26,5	4,95	18,68 %
55	30, 36 33	4,24	12,85 %	45, 37 41	5,66	13,8 %
56	15, 18 16,5	2,12	12,85 %	11, 15 13	2,83	21,77 %
57	14, 13 13,5	0,71	5,26 %	7, 10 8,5	2,12	24,94 %
58	19, 14 16,5	3,54	21,45 %	36, 28 32	5,66	17,69 %
59	21, 19 20	1,41	7,05 %	22, 23 22,5	0,71	3,16 %
60	292, 240 266	35,77	13,45 %	384, 432 408	33,94	8,32 %
TOTAL	915	-	19,11 %	992	-	21,21 %

En ambos casos los medidores de la precisión están dentro de los rangos más estrictos, por debajo de CV 25%. Como es habitual, el rango medio es el más preciso.

RANGO ALTO	SDA 5 días			Rapid YM Agar 2 días		
Muestra	Datos, Media	Sm	CV% Sm/Media	Datos, Media	Sm	CV% SM/Media
61	17, 20 18,5	2,12	11,46 %	49, 55 52	4,24	8,15 %
62	17, 12 14,5	3,54	24,41 %	8, 19 13,5	7,78	57,63 %
63	5, 14 9,5	6,36	66,95 %	26, 29 27,5	2,12	7,71 %
64	0, 0 0	0	-	0, 0 0	0	-
65	6, 15 10,5	6,36	60,57 %	9, 14 11,5	3,54	30,78 %
66	23, 18 20,5	3,54	17,27 %	18, 17 17,5	0,71	4,06 %
67	32, 29 30,5	2,12	6,95 %	49, 42 45,5	4,95	10,88 %
68	21, 16 18,5	3,54	19,14 %	16, 23 19,5	4,95	25,38 %
69	24, 37 30,5	9,19	30,13 %	20, 17 18,5	2,12	11,46 %
70	34, 38 36	2,83	7,86 %	41, 54 47,5	9,19	19,35 %
71	21, 13 17	5,66	33,29 %	23, 21 22	1,41	6,41 %
72	28, 22 25	4,24	16,96 %	29, 14 21,5	10,61	49,35 %
73	46, 38 42	5,66	13,48 %	55, 61 58	4,24	7,31 %
74	12, 24 18	8,49	47,17 %	14, 16 15	1,41	9,4 %
75	21, 24 22,5	2,12	9,42 %	20, 18 19	1,41	7,42 %
76	0, 0 0	0	-	0, 0 0	0	-
77	0, 0 0	0	-	0, 0 0	0	-
78	0, 0 0	0	-	0, 0 0	0	-
79	42, 40 41	1,41	3,44 %	72, 76 74	2,83	3,82 %
80	32, 22 27	7,07	26,19 %	23, 21 22	1,41	6,41 %
81	1, 1 1	0	0 %	0, 0 0	0	-
82	37, 44 40,5	4,95	12,22 %	88, 74 81	9,9	12,22 %
83	15, 21 18	4,24	23,56 %	21, 25 23	2,83	12,3 %
84	62, 48 55	9,9	18 %	44, 56 50	8,49	16,98 %
85	34, 38 36	2,83	7,86 %	46, 98 72	36,77	51,07 %
86	30, 27 28,5	2,12	7,44 %	26, 36 31	7,07	22,81 %
87	17, 22 19,5	3,54	18,15 %	36, 13 24,5	16,26	66,37 %
88	42, 46 44	2,83	6,43 %	94, 90 92	2,83	3,08 %
89	32, 63 47,5	21,92	46,15 %	50, 60 55	7,07	12,85 %
90	Incontables	-	-	Incontables	-	-
TOTAL	1.341	-	22,29 %	1,826	-	19,3 %

En ambos casos los medidores de la precisión están dentro de los rangos más estrictos, por debajo de CV 25%.

Como es habitual, el rango medio es el más preciso, seguido del rango alto y dejando en la cola al rango bajo.

Como es habitual y lógico, y aunque los datos pueda parecer que dicen lo contrario, el medio de cultivo no tiene incidencia en la precisión.

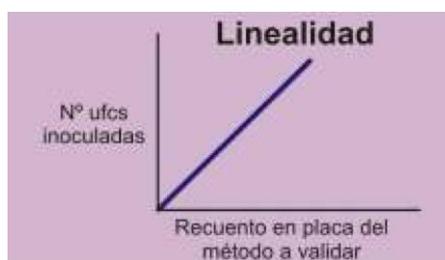
La precisión resulta bastante similar en ambos medios, ya que la precisión es una variable que depende más del analista que del medio. Como criterio de aceptabilidad debe saberse que los CV cuyo

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 algunos fabricantes de cepas cuantitativas (<100 es 50 ± 49). 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 excelentes.

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 SDA, 5 días	Rtos. medios en Rapoid YM Agar, 2 días
BAJO: 5 ufc/inóculo	406/60 col/placa = 6,77	404/60 col/placa = 6,73
MEDIO: 14 ufc/inóculo	915/60 col/placa = 15,25	992/60 col/placa = 16,53
ALTO: 37 ufc/inóculo	1.341 /60 col/placa = 22,35	1.826/60 col/placa = 30,43

En nuestro caso la linealidad ha quedado demostrada en ambos medios porque las medias obtenidas de los recuentos en placa van subiendo conforme suben los valores inóculo, en cada unos de los rangos, de una forma muy evidente, aún mejor en Rapid YM Agar que en SDA.

No se pueden interpolar valores, ya que en algunos casos ha habido rotura puntual de la linealidad a causa del potente efecto conservante de alguna matriz ante los hongos, que ha provocado algún recuento cero. 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.

Hay unos escasos falsos negativos, 100% achacables al poder inhibitorio de dos matrices (ya que se repiten en ambos medios y en los 3 rangos para un hongo concreto, en un caso Aspergillus –matrices 4 y

64- y en otro *Rhodotorula* –matrices 21, 51 y 81). En el rango más bajo que se puede incluir en una validación, no hay falsos negativos, por lo que ambos medios funcionan muy bien al respecto. Incluso en valores normalmente indetectables a causa de la incertidumbre (como son sólo 1 ó 2 ufc/inóculo).

De modo que en el total de 180 muestras (30 x 3 rangos x 2 medios) hay 6 con falso negativo de estos dos microorganismos entre ambos medios, mientras *Candida albicans* no ha sufrido ningún caso de falsos negativos.

La sensibilidad inclusiva es pues del $1-(6/180) \times 100 = 96,66 \%$, superior al típico 90% y al estricto 95%

8.6 Especificidad exclusiva: escasez de falsos positivos con diferentes interferentes. Como aprovechamos los blancos para inocular interferentes/acompañantes de bacterias, tenemos datos de este parámetro sin desperdiciar muestras. Falsos positivos de bacterias ha habido 5 de 18, aunque no pudimos comprobar si realmente eran falsos positivos bacterianos o simples contaminaciones de hongos durante las siembras. Lo único que sí está claro es que en el rango bajo, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* hicieron sinergia para combatir el Cloranfenicol de las placas de ambos medios, lo que demuestra que en la rutina del laboratorio, en cualquier medio con CAF, algunas colonias con aspecto de levadura podrían ser de bacterias.

8.7 Robustez del parámetro Hongos 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:

99,51 % del Rapid YM Agar en 2 días respecto al SDA en 5 días

107,14 % del Rapid YM Agar en 3 días respecto al SDA en 5 días

De modo que se puede considerar un parámetro bastante robusto: no hay enormes diferencias en el recuento entre ambos medios. La diferencia entre ambos es el tiempo de incubación, muy inferior en el Rapid YM Agar (2 días) respecto al del SDA (5 días).

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 análisis 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:

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

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 Hongos), 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 **Rapid YM Agar** a las 48 horas (**2 días**) a 35°C y el SDA a 25°C a los 5 días es del **114,7%**, excelente, superior al 90% necesario según ISO 11133-2 e incluso >95% de excelencia según los criterios más estrictos. Es más, superior al 100%, es decir, el Rapid YM mejora no sólo el tiempo de incubación 3 días, sino que también aumenta hasta un 15% los recuentos.

2ª La **exactitud** absoluta entre el **Rapid YM Agar** a las 72 h (**3 días**) a 35°C y el SDA a los 5 días a 25°C es del **124,47%**, excelente, superior al 90% necesario según ISO 11133-2 e incluso >95% de excelencia según los criterios más estrictos. Es más, superior al 100%, es decir, el Rapid YM reduce no sólo el tiempo de incubación 2 días, sino que también aumenta hasta un 24% los recuentos.

3ª La exactitud absoluta entre el Rapid YM Agar a las 48 h (2 días) y el mismo a las 72 h (3 días) es del 91,49 %, excelente, superior al 90% necesario según ISO 11133-2, por lo que ni siquiera hace falta esperar 3 días en el recuento de hongos y **con Rapid YM Agar basta con 2 días para dar resultados prácticamente idénticos a los de SDA en 5 días.**

4ª La **precisión** medida como Coeficiente de Variación CV%, ha sido en SDA, del 31,65% en rango bajo, del 19,1% en rango medio y del 22,29 % en rango alto; y para el Rapid YM Agar, del 24,92% en rango bajo, del 21,21% en ran.fgo medio y del 19,3 % en rango alto. Todas ellas muy inferiores al 70% estándar, por lo que cumplen ambos con este criterio de repetitividad. Y casi todas inferiores al criterio más estricto en microbiología, de <25%, por lo que felicitamos a las analistas.

6ª La **Linealidad**, la **Selectividad inclusiva**, la **Especificidad exclusiva** 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 Hongos en nuestras muestras, empleando Rapid YM Agar de MICROKIT frente al SDA, con mejores resultados: recuentos medios más elevados, más cercanos a la realidad; y recuentos fiables muchísimo más rápidos (2 días en vez de 5 días). El objetivo de este laboratorio era validar este medio en 48h, pero sabemos que es todavía más rápido (ver anexo fotográfico) y detecta y enumera perfectamente desde las primeras 22 h tanto las levaduras como los mohos.

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 (ya que dicha fórmula no está totalmente publicada, a causa de sus factores doping y otros componentes no declarados), 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 Hongos 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. 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, 10 de Marzo de 2023

12. 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”
- 5-Certificados de control de calidad de los medios, kits y cepas utilizados

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.

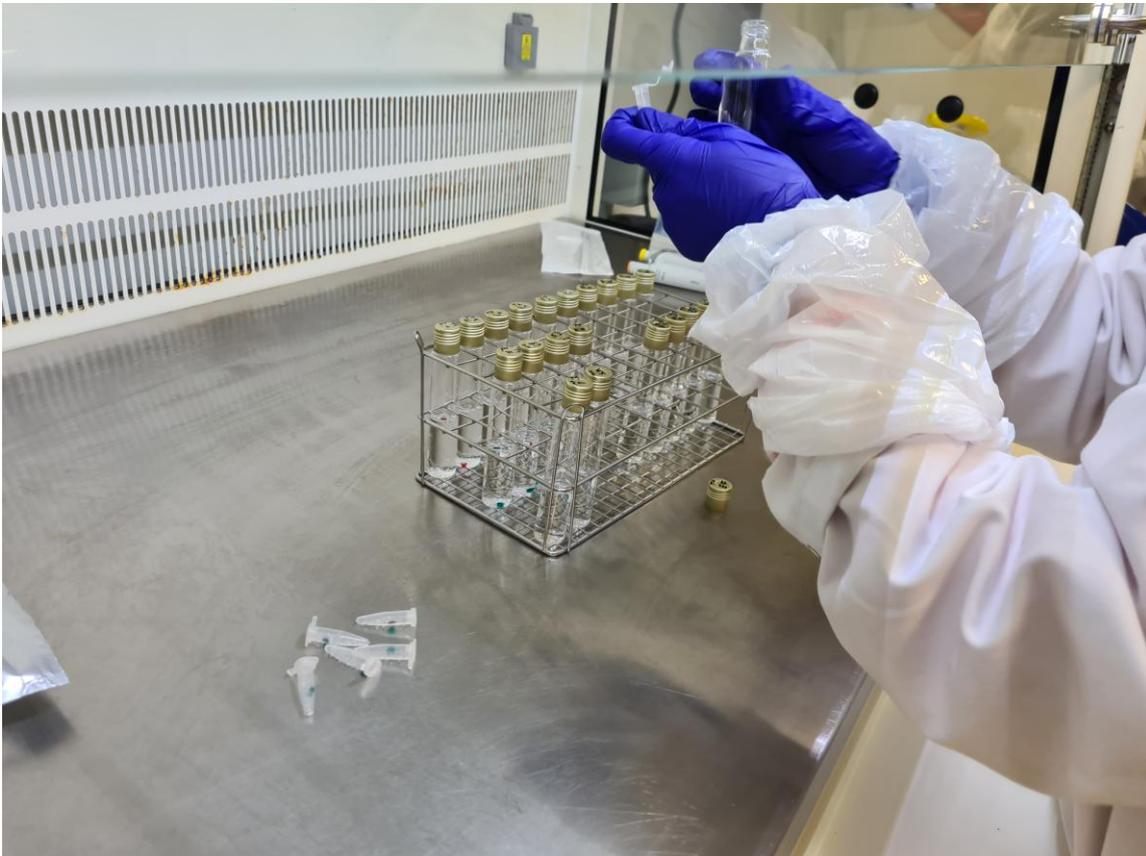
ANEXO 2: Propuestas de mejora para próximas validaciones

- 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)
- **Calcular para añadir 0,2 mL/placa en vez de 0,1, así aumentamos el rango inferior**

- En hongos no hará falta inocular en los rangos altos más de 100 colonias/placa, además 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



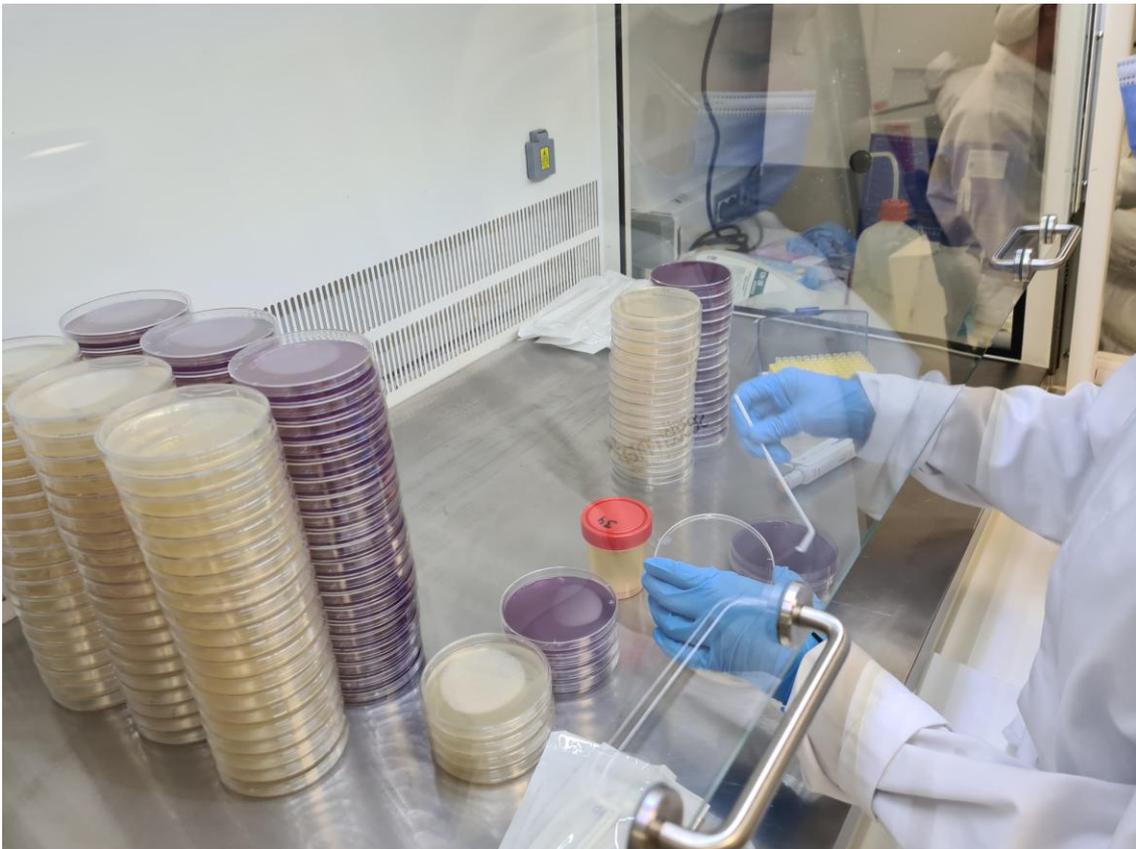
Revitalización y diluciones decimales de las cepas



Neutralización de las muestras en la solución madre (-1) e inoculación de las cepas, a concentraciones precisas, en las muestras



Torres de placas para sembrar: SDA (Izda) y Rapid YM Agar (Dcha)



Siembra de las 360 placas y extensión con asas Digralsky

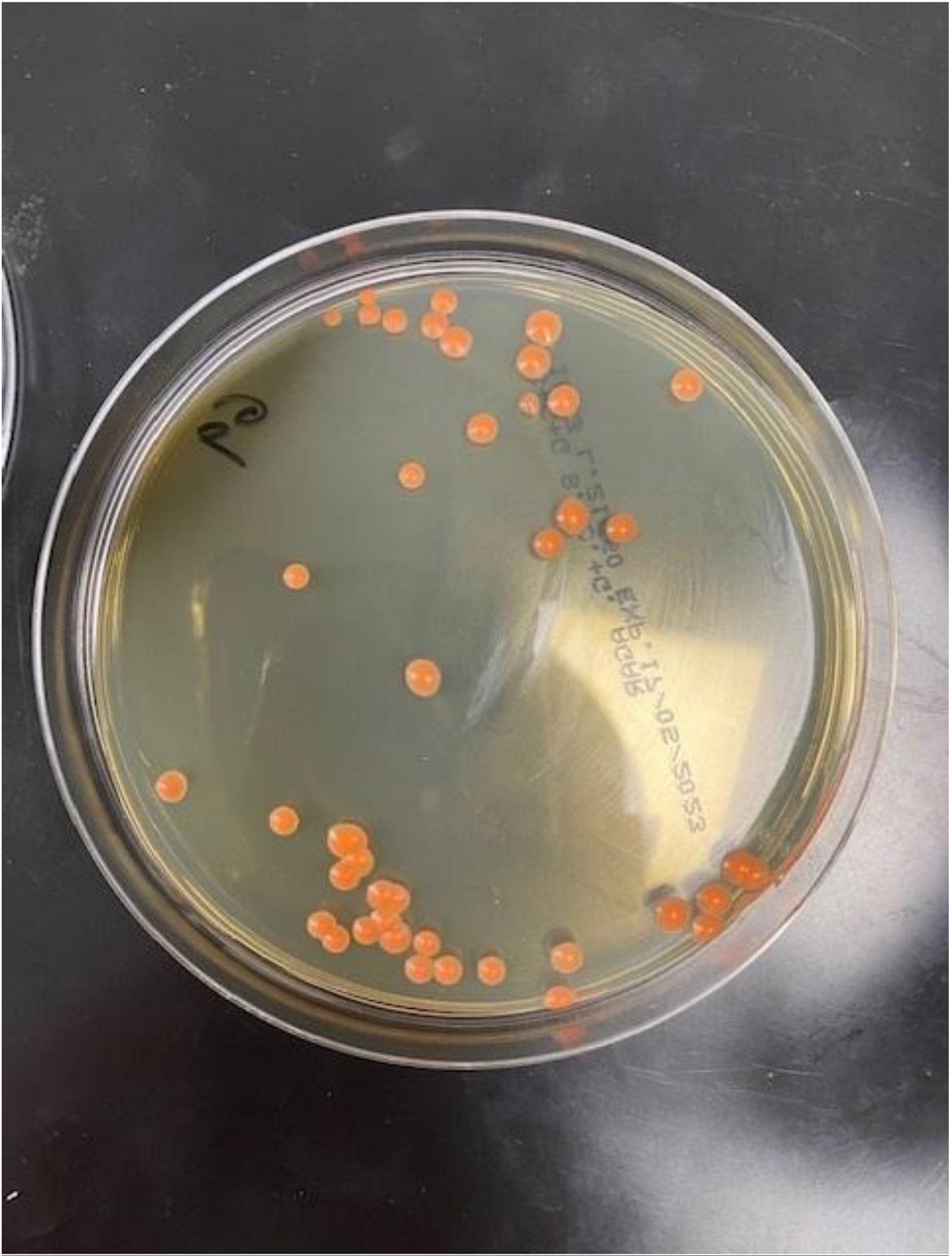


Incubación de las placas en estufa a 25°C (SDA) y en estufa a 35°C (Rapid YM Agar)

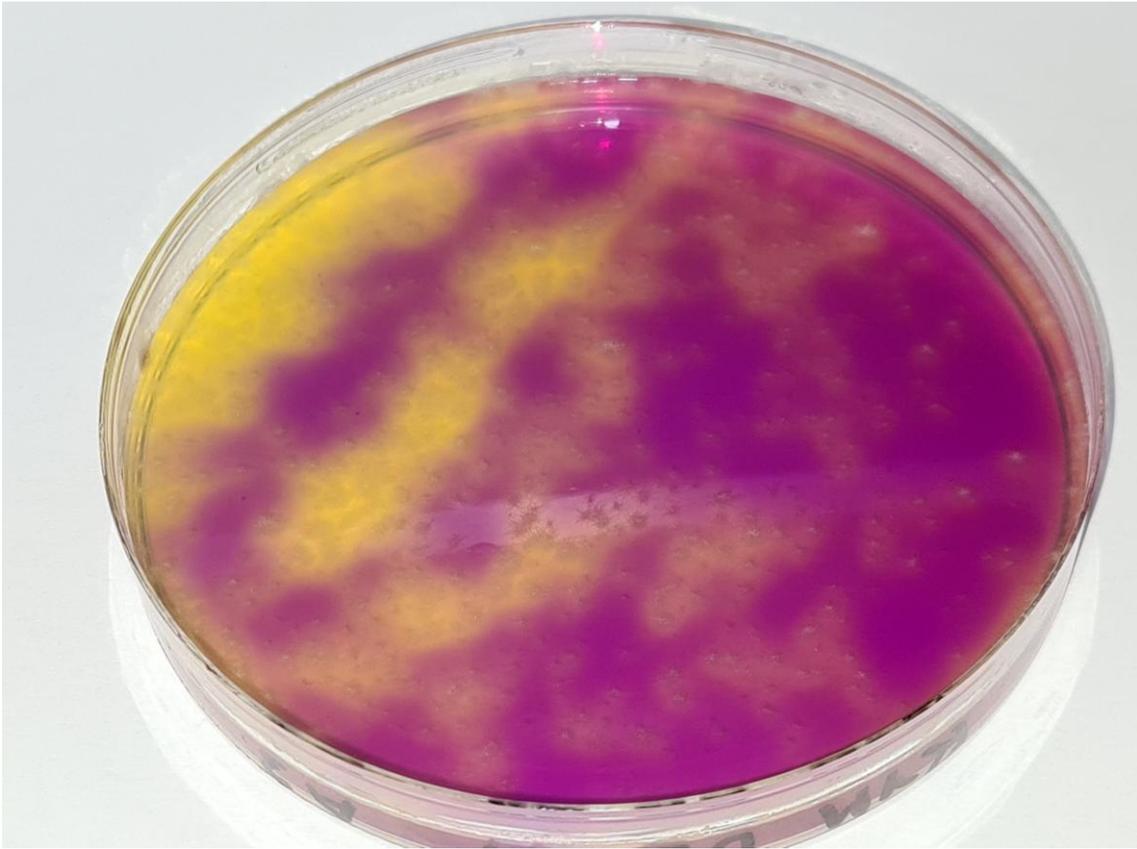


Lectura de las placas de Rapid YM Agar. Izda: *Candida albicans* sin viraje del medio, Dcha y abajo: Mohos con viraje del medio violeta a amarillo, que se cuentan muy bien

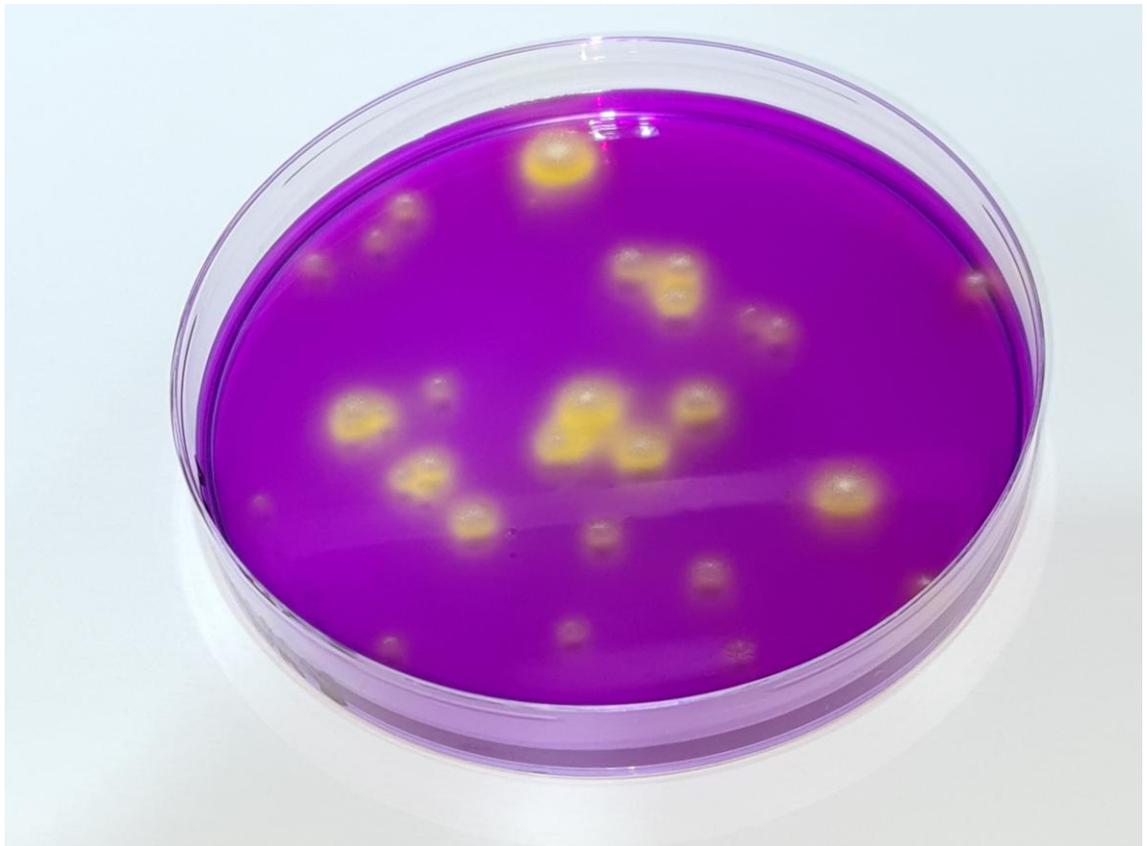




Levadura Rhodotorula en SDA



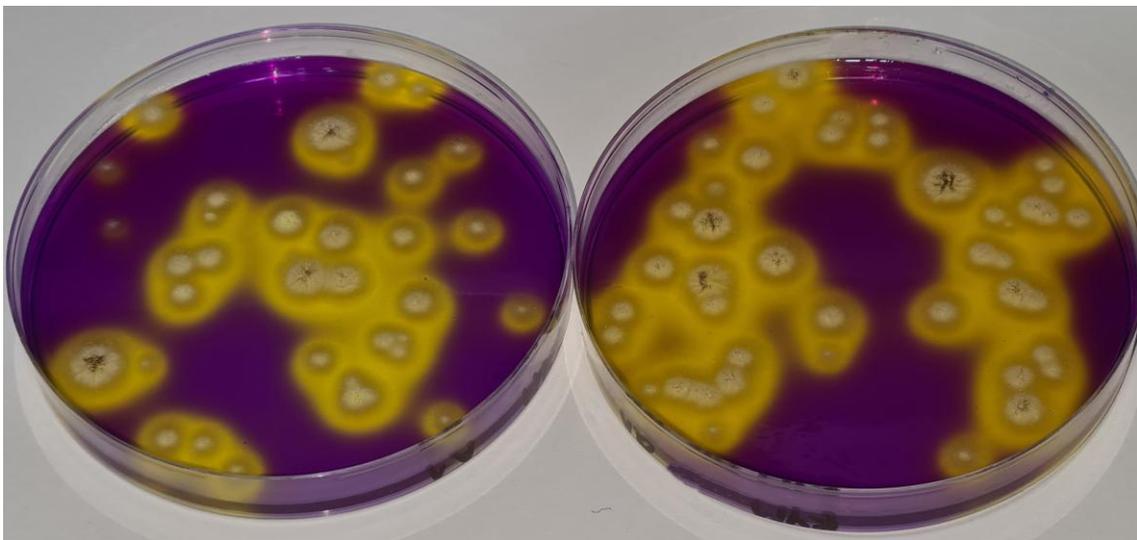
Aspergillus niger brasiliensis ya se detecta perfectamente en sólo 22 h, con manchas amarillas sobre el medio lila. Placa con recuento elevado.



Aspergillus niger brasiliensis en 29 h, con 26-28 colonias



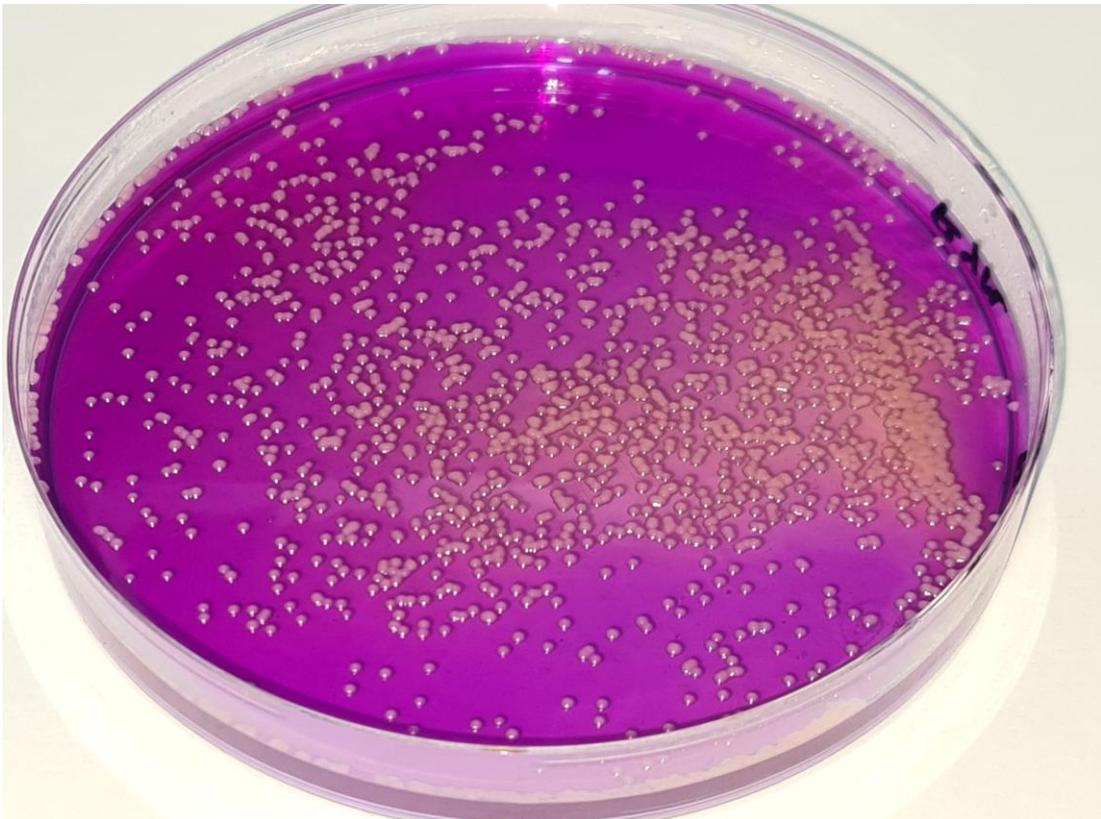
Aspergillus niger brasiliensis en 29 h, las colonias no invaden la placa y se cuentan perfectamente



Aspergillus niger brasiliensis en 36 h, ya incluso esporulando



Levaduras de extrema lentitud en su crecimiento habitual, como Rhodotorula mucilaginosa, se detectan en sus primeras 36 h de incubación



La misma levadura lenta Rhodotorula a las 48h de incubación



La levadura Candida albicans se detecta en las primeras 22 h



Aspecto de la misma Candida albicans a las 36h de incubación

ANEXO 4: Tablas de resultados "de campo"

Q872/22 inicio incubación 16:02

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO: Recuento de hongos

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

FECHA: 28/02/2023

cálculos acordes a nuestro recuento previo

RANGO BAJO

MÁTRICES	CEPAS [CONCENTRACIÓN CRECIENTE]	Volumen ufc/10g (= ufc/100 mL) Calculadas sembrando 0,2 mL/placa	Col./Placa calculadas	RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS				
				Scaf+G 5,5d	Rapidez 48h	Rapidez 72h	Rapidez 96h	
1	A: 2x10 ⁵ , 1 lent T ₁ da 150 col	0,14 mL T ₁ a Fr-100mL = 1 ufc/0,2 mL pl	1	4	3	1	2	3
2	C: 1x10 ⁷ , 1 lent T ₄ da 80 col	1,25 mL T ₄ a Fr-100mL = 1 ufc/0,2 mL pl	1	1	12	6	15	15
3	R: 2x10 ⁷ , 1 lent en T ₄ da 80 col	1,25 mL T ₄ a Fr-100mL = 1 ufc/0,2 mL pl	1	10	10	14	15	15
4	Aspergillus	0,28 mL T ₁ a Fr-100mL = 2 ufc/0,2 mL pl	2	25	24	0	0	0
5	Candida	2,5 mL T ₄ a Fr-100mL = 2 ufc/0,2 mL pl	2	4	21	18	19	22
6	Rhodotorula	2,5 mL T ₄ a Fr-100mL = 2 ufc/0,2 mL pl	2	10	11	1	13	10
7	Aspergillus	0,42 mL T ₁ a Fr-100mL = 3 ufc/0,2 mL pl	3	15	10	13	13	10
8	Candida	3,75 mL T ₄ a Fr-100mL = 3 ufc/0,2 mL pl	3	1	3	4	3	10
9	Rhodotorula	3,75 mL T ₄ a Fr-100mL = 3 ufc/0,2 mL pl	3	3	3	3	3	10
10	Aspergillus	0,56 mL T ₁ a Fr-100mL = 4 ufc/0,2 mL pl	4	14	14	15	15	15
11	Candida	5 mL T ₄ a Fr-100mL = 4 ufc/0,2 mL pl	4	6	11	13	15	15
12	Rhodotorula	5 mL T ₄ a Fr-100mL = 4 ufc/0,2 mL pl	4	6	3	3	4	3
13	Aspergillus	0,7 mL T ₁ a Fr-100mL = 5 ufc/0,2 mL pl	5	5	5	2	3	3
14	Candida	0,625 mL T ₃ a Fr-100mL = 5 ufc/0,2 mL pl	5	18	18	4	16	21
15	Rhodotorula	0,625 mL T ₃ a Fr-100mL = 5 ufc/0,2 mL pl	5	4	5	19	18	21
16	Aspergillus	0,91 mL T ₁ a Fr-100mL = 6 ufc/0,2 mL pl	6	3	5	6	8	10
17	Candida	0,75 mL T ₃ a Fr-100mL = 6 ufc/0,2 mL pl	6	13	20	20	21	20
18	Rhodotorula	0,75 mL T ₃ a Fr-100mL = 6 ufc/0,2 mL pl	6	3	8	2	4	4
19	Aspergillus	0,98 mL T ₁ a Fr-100mL = 7 ufc/0,2 mL pl	7	9	8	10	11	9
20	Candida	0,875 mL T ₃ a Fr-100mL = 7 ufc/0,2 mL pl	7	15	15	19	19	20
21	Rhodotorula	0,875 mL T ₃ a Fr-100mL = 7 ufc/0,2 mL pl	7	1	3	7	10	10
22	Aspergillus	1,12 mL T ₁ a Fr-100mL = 8 ufc/0,2 mL pl	8	8	8	10	11	10
23	Candida	1 mL T ₃ a Fr-100mL = 8 ufc/0,2 mL pl	8	30	28	25	29	26
24	Rhodotorula	1 mL T ₃ a Fr-100mL = 8 ufc/0,2 mL pl	8	5	16	6	8	8
25	Aspergillus	1,26 mL T ₁ a Fr-100mL = 9 ufc/0,2 mL pl	9	11	16	9	11	14
26	Candida	1,125 mL T ₃ a Fr-100mL = 9 ufc/0,2 mL pl	9	24	12	20	23	26
27	Rhodotorula	1,125 mL T ₃ a Fr-100mL = 9 ufc/0,2 mL pl	9	12	7	3	3	4
28	Blanco1 Ps.aerugioides, 1 lent T ₁	0,08mL T ₁ a Frasco100mL = 18 col/0,1 mLpl	0	0	0	0	0	0
29	Blanco2 St.hominis 8x10 ⁷ , 1 lent T ₁ aT ₂	0,12mL T ₂ a Frasco100mL = 15 col/0,1 mLpl	0	0	0	0	0	0
30	Blanco3 Blanco 3 Ps+St	0,08 + 0,12 = 33 col/0,1 mL pl	0	168	200	96	106	116

Diana: A: *Aspergillus niger* (necesitamos 6 lenticulas), C: *Candida albicans* (necesitamos 1 T₁, 1 T₃, 1 T₂), R: *Rhodotorula mucilaginosa* (necesitamos 1 T₄, 1 T₃, 1 T₂)
 Interferentes: *Pseudomonas deruginosa*, *Staphylococcus hominis*

Muestra	CEPAS	Volumen	Col./Placa	Scaf+G	Rapidez	Rapidez	Rapidez	Rapidez
Negros	Coliform 18 "	10 ⁶ T ₂	376	384	312	228	312	234
	Amoeba 20 col/placa	50 ⁶ T ₁	376	384	312	228	312	234
	Amoeba 18 "	10 ⁶ T ₂	376	384	312	228	312	234

VALIDACIÓN CUANTITATIVA PARÁMETRO: **Recuento de hongos**
 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: 28/02/2023

RANGO MEDIO

MATRICES	CEPAS [CONCENTRACIÓN CRECIENTE]	Volumen ufc/10g (= ufc/100 ml) calculadas señalando 0,2 ml/placa	Col/Placa calculadas	RESULTADOS SEGÚN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS					
				Scar+G 5,5d	Rapidez 48h	Rapidez 72h	Rapidez 96h		
31	Aspergillus	1,4ml T1 a F-100ml = 10 ufc/0,2 ml pl	10	24	20	14	30	23	32
32	Candida	1,25 ml T3 a F-100ml = 10 ufc/0,2 ml pl	10	8	8	4	12	5	12
33	Rhodotorula	1,25 ml T3 a F-100ml = 10 ufc/0,2 ml pl	10	0	0	4	1	1	1
34	Ps.aerugi1x10 ⁷ , 1 lent T1	0,16ml T1 a Frasco 100ml=38 col/0,1ml pl	0	0	0	1	1	1	1
35	Biancos St.hominis 8x10 ⁷ , 1lent T1aT2	0,24ml T2aFrasco 100ml=30 col/0,1 ml pl	0	0	0	1	1	1	1
36	Biancos 3 Ps+St	0,16 + 0,24 = 68 col/0,1 ml pl	0	0	0	1	1	1	1
37	Aspergillus	1,67 ml T1 a F-100ml = 11 ufc/0,2 ml pl	11	30	25	16	30	38	40
38	Candida	1,375 ml T3 a F-100ml = 11 ufc/0,2 ml pl	11	7	9	7	4	10	9
39	Rhodotorula	1,375 ml T3 a F-100ml = 11 ufc/0,2 ml pl	11	16	13	1	11	12	12
40	Aspergillus	1,82 ml T1 a F-100ml = 12 ufc/0,2 ml pl	12	31	23	17	34	32	35
41	Candida	0,15 ml T2 a F-100ml = 12 ufc/0,2 ml pl	12	6	6	6	6	13	6
42	Rhodotorula	0,15 ml T2 a F-100ml = 12 ufc/0,2 ml pl	12	15	13	13	17	13	19
43	Aspergillus	1,97 ml T1 a F-100ml = 13 ufc/0,2 ml pl	13	25	24	24	24	26	33
44	Candida	0,162 ml T2 a F-100ml = 13 ufc/0,2 ml pl	13	8	16	6	13	6	13
45	Rhodotorula	0,162 ml T2 a F-100ml = 13 ufc/0,2 ml pl	13	11	18	18	13	13	13
46	Aspergillus	2,12 ml T1 a F-100ml = 14 ufc/0,2 ml pl	14	32	30	35	28	37	28
47	Candida	0,174 ml T2 a F-100ml = 14 ufc/0,2 ml pl	14	7	10	10	10	11	10
48	Rhodotorula	0,174 ml T2 a F-100ml = 14 ufc/0,2 ml pl	14	13	19	14	16	19	16
49	Aspergillus	2,28 ml T1 a F-100ml = 15 ufc/0,2 ml pl	15	18	17	35	38	40	44
50	Candida	0,186 ml T2 a F-100ml = 15 ufc/0,2 ml pl	15	16	10	15	18	15	18
51	Rhodotorula	0,186 ml T2 a F-100ml = 15 ufc/0,2 ml pl	15	3	1	0	0	0	0
52	Aspergillus	2,43 ml T1 a F-100ml = 16 ufc/0,2 ml pl	16	30	34	24	45	34	52
53	Candida	0,198 ml T2 a F-100ml = 16 ufc/0,2 ml pl	16	15	11	21	14	24	16
54	Rhodotorula	0,198 ml T2 a F-100ml = 16 ufc/0,2 ml pl	16	32	22	30	23	35	26
55	Aspergillus	2,58 ml T1 a F-100ml = 17 ufc/0,2 ml pl	17	30	16	15	37	46	41
56	Candida	0,21 ml T2 a F-100ml = 17 ufc/0,2 ml pl	17	15	18	11	15	13	16
57	Rhodotorula	0,21 ml T2 a F-100ml = 17 ufc/0,2 ml pl	17	14	13	7	10	7	12
58	Aspergillus	2,73 ml T1 a F-100ml = 18 ufc/0,2 ml pl	18	19	14	36	28	37	30
59	Candida	0,21 ml T2 a F-100ml = 18 ufc/0,2 ml pl	18	21	19	22	18	23	19
60	Rhodotorula	0,21 ml T2 a F-100ml = 18 ufc/0,2 ml pl	18	29	26	43	34	39	46

Diana: A: *Aspergillus niger* (necesitamos 6 lenticulas), C: *Candida albicans* (necesitamos 1 T4, 1 T3, 1 T2), R: *Rhodotorula mucilaginosa* (necesitamos 1 T4, 1 T3, 1 T2), Interferentes: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus hominis*

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

cálculos acordes a nuestro recuento previo

FECHA: 28/02/2023

RANGO ALTO

MATRICES	CEPAS [CONCENTRACIÓN CRECIENTE]	Volumen ufc/10g (= ufc/100 ml) calculadas sembrando 0,2 ml/placa	Col/Placa calculadas	RESULTADOS SEGUN MEDIOS DE CULTIVO/MÉTODOS					
				Scat+G 5,5d	Rapidez 48h	Rapidez 72h	Scat+G 5,5d	Rapidez 48h	Rapidez 72h
61	Aspergillus	2,8 ml T1 a F100ml = 18 ufc/0,2 ml pl	20	17	20	49	55	49	55
62	Candida	0,23 ml T2 a F100ml = 20 ufc/0,2 ml pl	20	14	12	8	19	9	22
63	Rhodotorula	0,23 ml T2 a F100ml = 20 ufc/0,2 ml pl	20	5	14	26	25	27	29
64	Aspergillus	3,08 ml T1 a F100ml = 18 ufc/0,2 ml pl	22	0	0	0	0	0	0
65	Candida	0,26 ml T2 a F100ml = 22 ufc/0,2 ml pl	22	6	5	9	14	9	18
66	Rhodotorula	0,26 ml T2 a F100ml = 22 ufc/0,2 ml pl	22	23	18	18	12	18	14
67	Aspergillus	3,36 ml T1 a F100ml = 18 ufc/0,2 ml pl	24	32	15	49	42	41	43
68	Candida	0,28 ml T2 a F100ml = 24 ufc/0,2 ml pl	24	21	16	16	23	18	26
69	Rhodotorula	0,28 ml T2 a F100ml = 24 ufc/0,2 ml pl	24	24	37	20	17	20	20
70	Aspergillus	3,64 ml T1 a F100ml = 18 ufc/0,2 ml pl	26	34	38	41	54	44	64
71	Candida	0,30 ml T2 a F100ml = 26 ufc/0,2 ml pl	26	21	13	23	21	21	24
72	Rhodotorula	3,92 ml T1 a F100ml = 18 ufc/0,2 ml pl	26	18	27	29	14	34	18
73	Aspergillus	0,33 ml T2 a F100ml = 28 ufc/0,2 ml pl	28	46	38	55	67	55	64
74	Candida	0,33 ml T2 a F100ml = 28 ufc/0,2 ml pl	28	12	24	14	16	16	25
75	Rhodotorula	0,33 ml T2 a F100ml = 28 ufc/0,2 ml pl	28	21	24	20	18	28	18
76 Blanco7	<i>Ps.aeruginosa</i> 10 ⁷ , 1 lent T1	0,24ml T1 a Frasco100ml=54 col/0,1 mlpl	0	0	0	0	0	0	0
77 Blanco8	<i>St.hominis</i> 8x10 ⁷ , 1lent T1aT2	0,36ml T2 a Frasco100ml=45 col/0,1 mlpl	0	0	0	0	0	0	0
78 Blanco9	Blanco 3 P+St	0,24 + 0,36 = 99 col/0,1 ml pl	0	0	0	0	0	0	0
79	Aspergillus	4,2 ml T1 a F100ml = 18 ufc/0,2 ml pl	30	42	40	32	16	30	16
80	Candida	0,35 ml T2 a F100ml = 30 ufc/0,2 ml pl	30	32	22	23	21	26	24
81	Rhodotorula	0,35 ml T2 a F100ml = 30 ufc/0,2 ml pl	30	1	1	0	0	0	0
82	Aspergillus	5,6 ml T1 a F100ml = 18 ufc/0,2 ml pl	40	37	44	38	24	38	34
83	Candida	0,47 ml T2 a F100ml = 40 ufc/0,2 ml pl	40	15	21	21	15	15	36
84	Rhodotorula	0,47 ml T2 a F100ml = 40 ufc/0,2 ml pl	40	62	48	44	56	63	60
85	Aspergillus	7,0 ml T1 a F100ml = 18 ufc/0,2 ml pl	50	37	38	46	98	46	103
86	Candida	0,58 ml T2 a F100ml = 50 ufc/0,2 ml pl	50	30	22	26	36	36	38
87	Rhodotorula	0,58 ml T2 a F100ml = 50 ufc/0,2 ml pl	50	12	12	13	13	36	38
88	Aspergillus	1,46 ml T1 a F100ml = 19 ufc/0,2 ml pl	50	42	46	94	50	94	102
89	Candida	1,05 ml T2 a F100ml = 90 ufc/0,2 ml pl	90	32	43	50	60	50	16
90	Rhodotorula	1,05 ml T2 a F100ml = 90 ufc/0,2 ml pl	90	46	43	50	60	50	16

Diana: A: *Aspergillus niger* (necesitamos 6 lenticulas), C: *Candida albicans* (necesitamos 1 T4, 1 T3, 1 T2), R: *Rhodotorula mucilaginosa* (necesitamos 1 T4, 1 T3, 1 T2), Interferentes: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus hominis*

ANEXO 5 (no incluido en el pdf)

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