

Ejercicios de equivalencia ente métodos de análisis de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas de consumo

Ferrán Ribas

Aiguës de Barcelona - Comisión de Normalización y Validación de la SEM

E-mail: fribas@agbar.es

Una de las principales actividades a impulsar desde la Comisión de Validación y Normalización (CNV) de la SEM es la aprobación en España de métodos alternativos a los de referencia de análisis microbiológicos de aguas y alimentos.

En el campo de la microbiología de aguas, se tomó la decisión de iniciar los estudios dirigidos a este fin con los métodos de análisis de bacterias coliformes y *E. coli* en aguas de consumo.

Tanto la Directiva del Consejo de la Unión Europea 98/83/CE (3 noviembre 1998) como su transposición a la legislación española (Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero) aceptan cualquier método de análisis para los parámetros físico-químicos, con tal que cumpla con unos requisitos de exactitud, precisión y límites de detección y cuantificación. No obstante, para los parámetros de tipo microbiológico que deben analizarse de acuerdo con la normativa, se fijan unos métodos oficiales concretos de análisis, en general correspondientes a normas ISO. En el caso de las bacterias coliformes y *E. coli*, se trata de la norma UNE EN ISO 9308-1:2000 (abreviadamente, en lo sucesivo, ISO 9308). No obstante, está prevista la posibilidad de utilizar métodos alternativos, siempre y cuando los estados miembros faciliten toda la información de interés sobre dichos métodos y su equivalencia.

Desde el 15 de mayo de 2004 se dispone ya de un procedimiento estándar internacional (ISO 17994) para establecer la equivalencia entre métodos microbiológicos. Sin embargo, esta norma ya se venía utilizando desde hace cierto tiempo en su fase de borrador, lo que ha permitido que en diversos países europeos (Reino Unido, Holanda, Alemania, Finlandia e Italia) se hayan efectuado ya algunos estudios de este tipo.

El camino a seguir, una vez finalizado el estudio, en caso de que éste demuestre que el método alternativo produce resultados equivalentes o superiores a los del método oficial de referencia, es remitirlo a las autoridades sanitarias del país para que acepten las conclusiones del mismo y lo hagan llegar a la Unión Europea, con el fin de que sea aprobado como método cooficial en el país, tras la consulta al *European Microbiological Advisory Group* (EMAG), grupo de expertos en microbiología donde están representados los distintos países de la UE.

Aunque el Estado Español, de acuerdo con el RD 140/2003, acepta que los laboratorios utilicen cualquier método de análisis microbiológico con tal que haya sido validado, acreditado o haya demostrado su equivalencia en el propio laboratorio (equivalencia *in house*), desde la CNV de la SEM creemos interesante que los métodos más comúnmente utilizados en nuestro país o los que implican nuevos criterios y se están abriendo camino de modo creciente, sean sometidos a un ensayo de equivalencia en el cual participen distintos laboratorios (un mínimo de 5-6) y se analice un mínimo de unas 260 muestras, para que estos métodos alternativos puedan ser considerados, a nivel general (no de un laboratorio en particular) como cooficiales en España.

Métodos seleccionados

Tras discusiones previas con los laboratorios interesados, se han seleccionado tres métodos alternativos para su comparación con la norma ISO 9308:

1) El Colilert 18, que es un medio de cultivo líquido basado en un substato cromógeno y otro fluorógeno para determinar respectivamente la actividad de los enzimas β -galactosidasa (presente en los coliformes) y β -glucuronidasa (presente en *E. coli*). La actividad del primer enzima se manifiesta por la aparición de color amarillo en el medio de cultivo y la del segundo por la aparición de fluorescencia. Aunque se trata de un método basado en el número más probable (NMP), el alto número de réplicas analizadas (51 pocillos en un formato de bandeja denominado Quantitray) permite obtener resultados comparables con métodos basados en unidades formadoras de colonias (UFC) (**coordinación del ejercicio:** Ferran Ribas, Aguas de Barcelona).

2) Los agares cromogénicos, basados en los mismas actividades enzimáticas del Colilert, pero ligadas a dos substratos cromógenos. El medio de cultivo utilizado en los ensayos llevados a cabo es el agar Chromocult (**coordinación del ejercicio:** Eva Tusell, Mina Pública de Aguas de Terrassa).

3) La combinación de los medios de cultivo m-Endo para coliformes totales y m-FC para *E. coli* (**coordinación del ejercicio:** Corrie Allaert, Universidad de Lleida).

La coordinación general de los 3 ejercicios corre a cargo de Ferran Ribas, de la CNV de la SEM.

Mientras que los dos primeros métodos corresponden a nuevos criterios de definición de lo que es un coliforme (carácter β -galactosidasa positivo) y una *E. coli* (carácter β -glucuronidasa positivo), el tercero es un protocolo de trabajo que se viene utilizando desde hace muchos años en un buen número de laboratorios españoles y se basa, al igual que el método descrito en la norma ISO 9308, en la fermentación de la lactosa con producción de ácido, en el carácter oxidasa negativo (confirmación de coliformes totales) y, adicionalmente, en la obtención de indol del triptófano a 44 °C (confirmación de *E. coli*).

Análisis estadístico

De acuerdo con los principios del procedimiento ISO 17994, la comparación de dos métodos se basa en la diferencia relativa media de los recuentos confirmados. La diferencia relativa (x) se define como:

$$x_i = \ln(a_i) - \ln(b_i), \text{ donde}$$

a_i = recuento confirmado por el método alternativo en la muestra i , y

b_i = recuento confirmado por el método de referencia en la muestra i .

En el caso de que uno de los recuentos confirmados sea cero, la fórmula para la diferencia relativa se aplica bajo la forma

$$x_i = \ln(a_i + 1) - \ln(b_i + 1)$$

El motivo de este procedimiento es evitar la necesidad de omitir las muestras en que hay un cero. No obstante, si ambos resultados dan cero, la muestra no se considera para el estudio de equivalencia.

La evaluación de la equivalencia se basa en la diferencia relativa media (x) y en la incertidumbre expandida (U), calculada a partir de la desviación estándar de la media:

$$U = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Para que se considere que el método alternativo es equivalente o superior al método de referencia las únicas condiciones imprescindibles son que $x + U$ tenga valor positivo y que $x - U$ tenga un valor superior a $-0,10$. En caso de que se cumpla la segunda condición pero no la primera, se consideran ambos métodos prácticamente equivalentes, pero se trata de una situación excepcional que correspondería a incertidumbres expandidas anormalmente bajas.

También se utilizan técnicas estadísticas para evaluar la normalidad de los datos (Walk-Shapiro)

y las diferencias entre laboratorios (análisis de la varianza).

Como se ha comentado, se utilizan los datos analíticos confirmados. En los medios de cultivo basados en recuentos de células (UFC), se ha confirmado un máximo de 10 colonias presuntivas por muestra: todas las colonias cuando se detectan entre 1 y 10, y 10 colonias al azar cuando hay más de 10. En el caso particular del Colilert, este criterio se ha aplicado a los pocillos presuntivos para coliformes totales (amarillos); los cultivos obtenidos a partir de pocillos presuntivos para *E. coli* (amarillos y fluorescentes a la vez) han sido un subconjunto de los (diez) pocillos amarillos.

Las características bioquímicas utilizadas para la confirmación han sido, en los dos primeros ejercicios, además de las previstas en la norma ISO 9308, que definen el ensayo de equivalencia estándar (oxidasa para los coliformes totales y indol a 44 °C para *E. coli*), ácido de lactosa a 37 °C, ácido de lactosa a 44 °C, β -galactosidasa y β -glucuronidasa. En el tercer ejercicio, dado que todos los métodos ensayados se basan en la fermentación de la lactosa, no se han utilizado las pruebas adicionales de ácido de la lactosa a distintas temperaturas, pero si las relacionadas con los enzimas característicos de los medios cromogénicos y fluorogénicos. Todo ello ha permitido la obtención de una importante información complementaria a la estrictamente necesaria para la realización de un ensayo de equivalencia estándar, que será objeto de futuros estudios.

Realización de los ejercicios.

Estado actual

Bajo los auspicios de la CNV de la SEM, se efectuó entre finales de 2003 (a partir del último Congreso de la SEM) y principios de 2004 el reclutamiento de diversos laboratorios participantes, sobre todo entre los pertenecientes a abastecimientos de agua (a través de la Comisión 2ª de la Asociación Española de Abastecimiento y Saneamiento, AEAS) y entre los inscritos en los ejercicios de intercalibración EQUASE, para lo que se aprovecharon sus reuniones periódicas.

Tras la redacción de un protocolo y una jornada de entrenamiento (*training session*) que se desarrolló en la Universidad de Lleida en febrero de 2004, se iniciaron inmediatamente los ejercicios.

Una de las ventajas más importantes de la operativa de los ensayos de equivalencia es que no es preciso efectuar envíos de material entre laboratorios, sino que, por el contrario, cada laboratorio prepara sus propias muestras. El motivo es que, en este caso, lo más importante es que las mues-

tras que se ensayan paralelamente con los dos (o cuatro, en el caso del tercer ejercicio) métodos sean alícuotas procedentes exactamente del mismo frasco.

El estado actual de los tres ejercicios se describe a continuación.

Equivalencia ISO 9308 (TTC) - Colilert 18 Quantitray 51

Nueve laboratorios han analizado 333 muestras, habiéndose confirmado con los mismos criterios 3.055 cepas procedentes de Colilert y 2.800 cepas procedentes de TTC. De todas esas cepas se dispone de información acerca de las características bioquímicas anteriormente indicadas.

El trabajo experimental del ejercicio ya ha sido finalizado y se presentó un avance provisional de los resultados en la última reunión del Grupo de la SEM de Microbiología del Medio Acuático (septiembre-octubre de 2004).

Los resultados obtenidos son esperanzadores de cara a los objetivos propuestos en el ejercicio y está previsto tener a punto el informe sobre el mismo, actualmente en fase de redacción, para su entrega al Ministerio de Sanidad y Consumo antes de final de año.

Equivalencia ISO 9308 (TTC)/Cromogénicos

Siete laboratorios han analizado hasta el momento 184 muestras, habiéndose confirmado 1.552 cepas procedentes de cromogénicos y 1.602 procedentes de TTC. De todas esas cepas se dispone también, como de las procedentes del ejercicio anterior, de información acerca de todas las características bioquímicas anteriormente indicadas.

De acuerdo con el procedimiento ISO 17994, el número mínimo recomendado de muestras para este tipo de ensayos es de 256, por lo que, en este caso, el número de muestras analizadas es aún insuficiente. No obstante, para coliformes totales, tanto aplicando los criterios de confirmación del TTC como los descritos para cada método, se obtienen diferencias relativas medias positivas del orden de 0,25 - 0,35, lo cual significa que los valores obtenidos por el método alternativo son de un 25 a un 35 % superiores (Cuadro 1 y Figura 1).

En cambio, para *E. coli*, de acuerdo con los criterios de confirmación del TTC, el método de referencia presenta unos valores del orden del 20 % superiores. Por otro lado, si se hace intervenir en el criterio de confirmación la β -glucuronidasa, esta diferencia se reduce a menos de un 8 %, mejorando el rendimiento del cromogénico, pero, por la incertidumbre expandida asociada, el

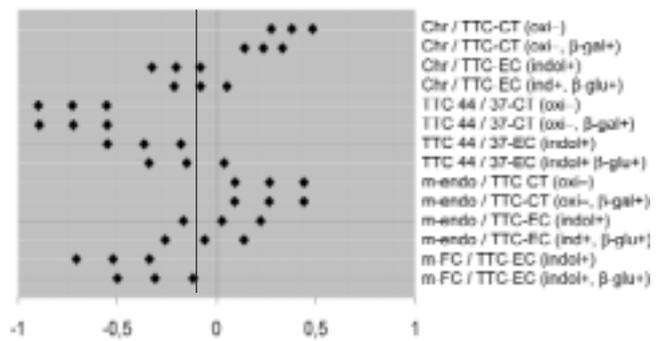


Figura 1. Resumen provisional de parámetros de equivalencia ($x-U$, x , $x+U$). Coliformes totales (CT) y *E. coli* (EC)

número de muestras es aún demasiado bajo para poder sacar conclusiones definitivas. Mientras que el ejercicio podría darse por finalizado para coliformes totales, es preciso analizar más muestras para poder opinar con argumentos sólidos sobre el comportamiento de *E. coli*.

Equivalencia ISO 9308 (TTC) - m-Endo/m-FC.

Cinco laboratorios han analizado hasta el momento 164 muestras, pero aún están pendientes de estudio los perfiles de las cepas aisladas en los distintos laboratorios por los diferentes métodos. En este caso, como ya indicamos, no se incluyen los ensayos de ácido de lactosa a 37 °C y 44 °C, por lo que los perfiles comprenden únicamente cuatro características: oxidasa, indol a 44 °C, β -galactosidasa y β -glucuronidasa. No obstante, han podido efectuarse análisis de equivalencia provisionales de acuerdo con el procedimiento ISO 17999.

En este ejercicio, se han analizado para cada muestra no dos medios de cultivo paralelos (como en los ejercicios anteriores) sino cuatro que, además, implican jugar con dos temperaturas de incubación distintas: TTC a 37 °C, TTC a 44 °C, m-Endo a 37 °C y m-FC a 44 °C.

Es interesante constatar que, en este estudio, aunque no se utilicen medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos, se ha considerado interesante utilizar también los criterios de confirmación propios de este tipo de nuevos medios de cultivo: β -galactosidasa para coliformes totales y β -glucuronidasa para *E. coli*.

Se han efectuado las comparaciones de equivalencia de todas las combinaciones posibles entre los cuatro medios de cultivo, pero sólo nos referiremos a aquellas en que interviene el método de referencia (TTC a 37 °C):

- TTC 44/TTC 37 (Coliformes totales y *E. coli*)
- m-Endo 37/TTC 37 (Coliformes totales y *E. coli*)
- m-FC 44/TTC 37 (*E. coli*)

Cuadro I. Resumen provisional de los parámetros de equivalencia de los ejercicios no finalizados: Cromógenos/TTC y m-endo, m-FC/TTC.

COMPARACIÓN	MICROORGANISMO	CRITERIO	x	U	x - U	x + U	n
Chromocult/TTC 37	Coliformes totales	oxi ⁻ (1)	0,3794	0,1036	0,2758	0,4830	184
		oxi ⁻ , β-gal ⁺ (2), lac ⁺ (3)	0,2358	0,0953	0,1405	0,3311	180
	<i>E. coli</i>	indol ⁺	-0,2041	0,1221	-0,3262	-0,0820	177
		indol ⁺ , β-glu ⁺ (4)	-0,0809	0,1330	-0,2139	0,0521	170
TTC 44/TTC 37	Coliformes totales	oxi ⁻	-0,7265	0,1723	-0,8989	-0,5542	162
		oxi ⁻ , β-gal ⁺	-0,7220	0,1710	-0,8930	-0,5509	162
	<i>E. coli</i>	indol ⁺	-0,3649	0,1843	-0,5492	-0,1807	137
		indol ⁺ , β-glu ⁺	-0,1515	0,1890	-0,3404	0,0375	137
m-endo 37/TTC 37	Coliformes totales	oxi ⁻	0,2664	0,1730	0,0934	0,4393	163
		oxi ⁻ , β-gal ⁺	0,2646	0,1743	0,0903	0,4390	163
	<i>E. coli</i>	indol ⁺	0,0267	0,1943	-0,1676	0,2209	142
		indol ⁺ , β-glu ⁺	-0,0607	0,1983	-0,2590	0,1375	126
m-FC 44/TTC 37	<i>E. coli</i>	indol ⁺	-0,5220	0,1840	-0,7059	-0,3380	134
		indol ⁺ , β-glu ⁺	-0,3096	0,1907	-0,5003	-0,1189	127

(1) Oxidasa⁻; (2) β-galactosidasa⁺; (3) lactosa⁺; (4) β-glucuronidasa⁺.

También resulta interesante la comparación m-FC 44/TTC 44. No obstante, como al comparar TTC 44 con TTC 37 se obtiene, en todas sus variantes, que las diferencias relativas son siempre negativas (es decir, los resultados son significativamente superiores con el TTC 37), se obviarán las referencias a esta comparación. Aunque la propia norma ISO 9308 permite para analizar *E. coli* utilizar el TTC a 44 °C, tomarse en serio una comparación m-FC 44/TTC 44 sería hacer jugar con una ventaja de partida injustificable al m-FC, que en sus resultados se aproxima más al TTC 44 que al TTC 37.

La comparación m-Endo 37/TTC 37 para coliformes totales está dando, por el momento, una diferencia relativa del orden de 0,26 - 0,27, es decir, se obtienen unos valores muy parecidos independientemente del criterio de confirmación considerado, con una incertidumbre que permite hablar de diferencias significativas a favor del m-Endo.

En cambio, para *E. coli* prácticamente no existen diferencias medias (el m-Endo es un 3 % superior si clasificamos a *E. coli* sólo por el indol y un 6 % inferior si hacemos intervenir también la β-glucuronidasa). Aunque, de momento, la conclusión del estudio de equivalencia es que se requieren más muestras, es probable que, al estudiar un mayor número de ellas, se llegue a la con-

clusión de que ambos métodos son equivalentes para *E. coli*.

El panorama no parece tan esperanzador para el m-FC. La comparación m-FC/TTC 37 detecta una diferencia relativa media de -0,31 ó -0,52, según los criterios de identificación, siendo, por tanto, los resultados del TTC 37 significativamente superiores (de un 31 a un 52 %). En este caso parece difícil que, aunque se estudien muchas más muestras, se logre invertir la tendencia de los resultados, por lo que resulta prácticamente imposible que se pueda llegar a encontrar que el m-FC sea equivalente. En realidad, la propia incubación a 44 °C, si bien es cierto que es mucho más selectiva para coliformes termotolerantes (esto se refleja en las características de las cepas aisladas por los distintos medios de cultivo) y, por tanto, para *E. coli*, en contrapartida también recupera una menor proporción de los microorganismos en favor de los cuales se hace la selección que una incubación más genérica (a 37 °C) en un medio menos selectivo. Este último sólo puede llegar a ser un problema para el aislamiento de *E. coli* en aquellas muestras en que la microbiota acompañante no permita un desarrollo adecuado o un correcto aislamiento de *E. coli*. No obstante, en esos casos, no existe la menor duda de que la mejor elección sería el Colilert.