



# FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

## Validación de un método de detección y cuantificación de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras ambientales

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Diciembre 2019

**Autor: Luis Maestre Verdú**

Modalidad: Experimental

Tutores: Esther Caparrós Cayuela.

Elena Soria Soria

## Contenido

1	Resumen	1
2	Introducción	2
2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
2.1.1	Taxonomía y filogenia	3
2.1.2	Patogenicidad y diagnóstico	3
2.1.3	Epidemiología y manifestaciones	4
2.2	Biofilm	5
2.3	Resistencia a antibióticos	5
2.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el medio ambiente	6
2.5	Validación de un método de ensayo microbiológico	7
3	Antecedentes y justificación del trabajo	8
4	Objetivos	11
5	Material y métodos	12
5.1	Cepas de referencia	12
5.2	Aislados ambientales	12
5.3	Medios de cultivo	13
5.4	Kit Pseudalert®	15
5.5	Procedencia de las muestras empleadas en la validación.	16
5.5.1	Muestras de agua de piscina	16
5.5.2	Muestras de arena de playa	17
5.6	Procedencia de las muestras empleadas en el estudio ambiental.	18
5.7	Preparación de inóculos y muestras	19
5.7.1	Titulación de los inóculos	19
5.7.2	Preparación de las muestras	20
5.8	Procesado de las muestras	20
5.8.1	Filtrado e incubación	20
5.8.2	Procesado de las muestras de la arena de playa	21
5.8.3	Lectura de resultados y confirmación	22
5.9	Metodología de la validación	27
5.9.1	Recuperación	27
5.9.2	Reproducibilidad	27
6	Resultados y discusión	27
6.1	Validación	27

6.1.1	Recuperación relativa	27
6.1.2	Reproducibilidad	30
6.2	Estudio de muestras ambientales	33
6.2.1	Muestras ambientales de agua de piscina	33
6.2.2	Muestras ambientales de arena de playa	34
6.3	Estudio de interferentes	36
7	Discusión	37
8	Conclusiones	42
9	Bibliografía	43



## 1 Resumen

La identificación rápida de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras de agua de piscina es un objetivo fundamental en los laboratorios de análisis de calidad de aguas debido a la importante patogenicidad de este microorganismo. Con el fin de agilizar este proceso se realizó este trabajo para estudiar la posibilidad de usar el método Pseudalert® frente a los métodos de la norma ISO en el laboratorio de microbiología de la empresa LABAQUA. Pseudalert® es capaz de presentar resultados sin necesidad de comprobación en 24h, con un tiempo de detección menor al método ISO. El estudio se realizó sobre muestras de agua de piscina y sobre muestras de arena de playa. Los resultados muestran la eficacia igual o mejor de Pseudalert® frente al método ISO para determinación de *Pseudomonas aeruginosa* en las muestras de agua de piscina. Sin embargo, nuestros resultados determinan que Pseudalert® no es útil en muestras de arena de playa.



## 2 Introducción

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

El género *Pseudomonas* comenzó aglutinando bacterias sin capacidad de fermentación con características morfológicas en común, denominadas “pseudomonas” por su disposición en parejas, similar a una célula única. El género ha sufrido modificaciones, dividiéndose y naciendo a partir de él otros diferentes, como *Burkholderia* y *Stenotrophomonas* entre otros. El género *Pseudomonas* sigue constituido por más de 200 especies, de las cuales la más destacada es *Pseudomonas aeruginosa* (aeruginosa, repleto de óxido de cobre o verde).<sup>1</sup>

Podrían considerarse características generales del género *Pseudomonas* su morfología de bacilos rectos o curvos (nunca vibroides), con un tamaño entre 0.5 y 1  $\mu\text{m}$  y que no generan esporas. También presentan una pared celular gramnegativa, con flagelos polares únicos o múltiples; carecen de cubiertas, apéndices o yemas; realizan metabolismo respiratorio, nunca fermentativo, aunque existe la posibilidad de producir, aeróbicamente, cantidades pequeñas de ácido a partir de glucosa y la utilización de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, no polímeros. Algunos microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas* son quimiolitótrofos y usan  $\text{H}_2$  o  $\text{CO}$  como donador de electrones, también pueden usar nitrato como aceptor de electrones anaeróbico, e incluso algunos pueden usar arginina como fuente de energía en anaerobiosis.<sup>2</sup>

El grupo fluorescente, formado por *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. veronii*, *P. monteilii*, y *P. mosselii*, se caracteriza por la secreción del pigmento fluorescente pioverdina (presenta una tonalidad amarillo-verde-marrón). *P. aeruginosa* también es capaz de secretar piocianina (azul), piomelanina (marrón-negro) y piorrubina (rojo), a diferencia del resto de los componentes del grupo fluorescente. Otra característica que distingue a *P. aeruginosa* del resto de pseudomonas fluorescentes clínicamente relevantes es la capacidad de crecimiento a  $42^\circ\text{C}$  <sup>3</sup>, además de presentar un solo flagelo polar y ser capaz de desnitrificar.<sup>2</sup>

### 2.1.1 Taxonomía y filogenia

*Pseudomonas aeruginosa* pertenece al phylum *Proteobacterias*. Una de las singularidades de este filo es la ausencia de características morfológicas, fenotípicas y ambientales homogéneas. Forma parte de la clase  $\gamma$ -Proteobacterias junto a con otros géneros como *Legionella*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia*...<sup>4</sup> Dentro de esta clase se ubica en el orden Pseudomonadales, familia Pseudomonadacea; clasificado en el género *Pseudomonas* (ya descrito por Migula en 1894), presentando un contenido representativo de G + C de 58-69%.<sup>5</sup>

### 2.1.2 Patogenicidad y diagnóstico

*P. aeruginosa* presenta diversos factores de virulencia, entre los que destacan adhesinas, toxinas y enzimas.

La adherencia está facilitada por flagelos, pili y lipopolisacáridos (LPS), siendo el componente de lípido A el responsable de la actividad de la endotoxina, y por alginato, que interviene en la formación de biofilm.

Respecto a las toxinas, se cree que la exotoxina A (ETA) es uno de los factores más virulentos producidos por *P. aeruginosa*, con una actividad similar a la toxina diftérica, aunque menos potente. Los pigmentos secretados también poseen actividad patógena. La piocianina cataliza la producción de superóxido y peróxido de hidrógeno, y estimula la liberación de interleucina 8, que genera la atracción de neutrófilos mientras que la pioverdina regula diversos factores de virulencia, incluida la ETA.<sup>1</sup>

Dos elastasas, LasA (serina proteasa) y LasB (metaloproteasas), degradan la elastina de forma sinérgica, generando daños en los tejidos con elastina, en el parénquima pulmonar y lesiones hemorrágicas. Degradan también los componentes del complemento resistiendo así la quimiotaxis y la actuación de los neutrófilos. De la misma forma actúa la proteasa alcalina, consiguiendo junto a las elastasas la diseminación de *P. aeruginosa* y la destrucción celular.

La fosfolipasa C, hemolisina termolábil, degrada los lípidos y lecitina, facilitando la destrucción tisular.<sup>1</sup>

Las exoenzimas S y T son toxinas extracelulares, introducidas en células diana producen un daño epitelial que facilita la diseminación de las bacterias, invasión

celular y necrosis. A pesar de estos factores de virulencia, se considera que deben colaborar múltiples factores para que se produzca enfermedad, como es la alteración de las líneas de defensa primarias o una vía para esquivarlas.<sup>1</sup>

A la hora de aislar *P. aeruginosa* existen medios de cultivo selectivos para el aislamiento en muestras clínicas o ambientales. La identificación es sencilla sobre la base de las características de la colonia, la pigmentación y el olor característicos, así como mediante pruebas bioquímicas sencillas (producción de oxidasa, oxidación de la glucosa, pero no fermentación, presencia de arginina-dehidrolasa) y crecimiento a 42°C. Los sistemas comerciales de identificación son también bastante fiables. Las diversas técnicas de epidemiología molecular (que han sustituido los sistemas basados en biotipia, fagotipia y bacteriocinotipia) como son la electroforesis en gel de campo pulsante, ribiotipia, o las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ofrecen excelentes resultados.<sup>6</sup>

### 2.1.3 Epidemiología y manifestaciones

Encontramos *P. aeruginosa* en faringe y heces en un 2-10% de población sana, siendo mucho más elevadas las tasas de colonización en pacientes hospitalizados. La infección es atípica en personas previamente sanas y es una de las mayores causas de infección invasora en pacientes hospitalizados con enfermedades graves como fibrosis quística y quemaduras extensas.<sup>5</sup>

La escasa necesidad de nutrientes para sobrevivir y la capacidad de proliferar en agua puede conducir a una gran contaminación de líquidos no estériles, como humidificadores de respiradores o en acumulaciones de agua en superficies. Se observa proliferación en medicamentos, solución de lentes de contacto, desinfectantes, fregaderos, grifos. El riesgo estriba en las personas que están predispuestas para la infección. *P. aeruginosa* es el agente bacteriano que complica, con mayor frecuencia, la situación de pacientes con fibrosis quística. Una vez establecido, es casi imposible de erradicar, siendo esta infección la principal causa de morbilidad y mortalidad en estos pacientes.<sup>5</sup>

Aproximadamente el 80% de las bacteriemias por *P. aeruginosa* tienen origen nosocomial debido a las manipulaciones a las que están sometidos los pacientes. Puede manifestarse de diversas maneras: en infecciones de las vías respiratorias (neumonía asociada a la ventilación mecánica, neumonía adquirida

en la comunidad, agravamiento de la fibrosis quística), endocarditis, infecciones del sistema nervioso central, infecciones del oído (otitis externa, otitis externa maligna, otitis media aguda, otitis media crónica, mastoiditis), infecciones oculares (queratitis, endoftalmitis), infecciones óseas y articulares (espondilitis, artritis esternocostoclavicular, osteoartritis de la sínfisis púbica, osteítis del pie, osteomielitis por contigüidad), infecciones urinarias, infecciones del tracto gastrointestinal (enterocolitis necrosante, infección perianal)<sup>6</sup>. Las manifestaciones más comunes son infecciones dérmicas, neumonía, otitis externa (otitis del nadador) e infección ocular.<sup>7</sup>

## 2.2 Biofilm

*P. aeruginosa* es conocido como un notable formador de biofilm. A medida que se van acumulando los compuestos que actúan como señalizadores intercelulares (moserina-lactonas aciladas), estos transmiten a otras células adyacentes que la población está aumentando, llevando esto al desarrollo del biofilm. La razón para la formación de biofilm es que actúa como medio de autodefensa ante fuerzas físicas que podrían arrastrar células no adheridas. También sirve como protección a la fagocitosis de células del sistema inmunitario y la penetración de antibióticos. El conjunto de estas acciones mejora la supervivencia de las células del biofilm. El desarrollo de biofilm permite la generación de un nicho favorable para las células, formado sobre superficies ricas en nutrientes fijan las células a lugares en los que los nutrientes abundan o se reponen constantemente. Al permitir que las células convivan en contacto facilita la comunicación intercelular y aumenta las posibilidades de supervivencia, además de facilitar también el intercambio de genes.<sup>2</sup>

En pacientes con fibrosis quística es frecuente la formación de un biofilm tenaz de *P. aeruginosa* en los pulmones, produciendo síntomas de neumonía.<sup>2</sup>

## 2.3 Resistencia a antibióticos

Dentro del grupo de bacterias patógenas, *P. aeruginosa* muestra una resistencia más consistente a muchos antimicrobianos. Uniformemente a penicilina, ampicilina, cefalotina, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas y los primeros aminoglucósidos.<sup>5</sup>

*P. aeruginosa* se caracteriza por una baja permeabilidad de la membrana externa, la formación de biofilm protector, sistemas de expulsión activa (bombas de eliminación, concretas o multifármaco), producción de AMPc, una gran capacidad de mutación y adaptación para generar otros  $\beta$ -lactamasas, además de presentar resistencia a aminoglucósidos por producción de enzimas modificadoras. El conjunto de todas estas capacidades dota a *P. aeruginosa* de una gran resistencia a antibióticos.<sup>6</sup>

La frecuente adquisición de resistencia antimicrobiana limita la utilidad de los antibiogramas como herramienta de identificación.<sup>3</sup>

La alta resistencia a antibióticos presentada por *P. aeruginosa* ha sido destacada por la OMS, que ha incluido el microorganismo dentro del grupo de patógenos para los que es necesario el desarrollo de nuevos antibióticos y se encuentran en situación crítica.<sup>8,9</sup>

#### 2.4 *Pseudomonas aeruginosa* en el medio ambiente

Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, en el agua (ríos, lagos, depósitos, duchas, bañeras, piscinas y piscinas de hidromasaje, etc.), en los suelos húmedos, en los vegetales y en los materiales húmedos (alimentos, fómites); también puede formar parte de la flora microbiana normal saprófita de las zonas húmedas de la piel (axilas, conducto auditivo, región perineal y mucosas). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero puede tolerar temperaturas de hasta 45°C-50°C. Puede sobrevivir durante al menos 70 días en agua destilada.<sup>7</sup>

La capacidad de resistencia a la temperatura, que le permite presentar crecimiento hasta los 42°C, a la escasez de nutrientes en el medio junto a la resistencia a factores físicos que le aporta la producción de biofilm y su capacidad de crecimiento en medios aerobios y anaerobios hacen de *P. aeruginosa* una bacteria ubicua y resistente.<sup>3</sup>

El origen principal de la contaminación en piscinas son personas infectadas con la bacteria que transfieren ésta al agua. El ambiente húmedo y caliente de piscinas, bañeras de hidromasaje y spa genera las condiciones ideales para el crecimiento en el ambiente circundante, como son superficies, bancos, sumideros y suelos, haciendo posible que otros bañistas se conviertan en portadores y la reintroduzcan en piscinas. Además, aquellas piscinas

contaminadas que cuenten con sistemas de aerosoles facilitan la inhalación del microorganismo y de su endotoxina. Se considera que las altas temperaturas y movimientos de agua de las bañeras de hidromasaje favorezcan la sudoración y descamación de la piel, generando un ambiente de protección y aumentando la carga orgánica que actúa como fuente de nutrientes.<sup>10</sup>

Debido a su habilidad para formar biofilm en superficies, *P. aeruginosa* puede incluso sobrevivir en aguas tratadas con niveles residuales de cloro, agua destilada y en soluciones desinfectantes.<sup>11</sup>

*P. aeruginosa* también se encuentra en arenas de playa, con una concentración mayor en arena que en agua marina. La arena actúa como regulador y protege de radiaciones UV y de niveles altos de salinidad. Los mayores niveles de concentración de *P. aeruginosa* en arena se observan en aquellos lugares donde predomina la actividad humana, un indicador de que, como en las piscinas, los humanos actúan como reservorio y vector del microorganismo.<sup>12</sup>

## 2.5 Validación de un método de ensayo microbiológico

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005<sup>13</sup>, reflejan la obligación de los métodos de ensayo y materiales e instrumentación utilizados en un laboratorio de análisis microbiológico a cumplir un intervalo de parámetros obligatorios para la adecuada realización de las técnicas.

Aquellos laboratorios que emiten sus resultados públicamente, y que están acreditados por ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) tienen la obligación de validar sus métodos de ensayo. A través de este procedimiento se establecen las características y límites experimentales del método a validar, mostrando que cumple los parámetros proporcionados por el fabricante. Se detallan los procesos para la correcta realización del método describiendo el objetivo deseado, se controlan los equipos, que deben estar calibrados, y se evalúan los resultados correctos por parte de analistas cualificados.

La validación de los métodos microbiológicos se realiza siguiendo las recomendaciones diseñadas en los Criterios Específicos de Acreditación ENAC-20<sup>14</sup>, los cuales complementan a la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005<sup>13</sup> en materia de validaciones de método de ensayo microbiológico. Este primer documento determina que todo método desarrollado en laboratorio debe ser validado, asegurando como aptos los parámetros obtenidos para la utilización

del método. Debido a las diferentes características presentadas por cada método, es necesario realizar la validación de forma tan extensa como sea necesaria para cada uno de los diferentes métodos, evaluándose tanto el ámbito de aplicación, como las actividades realizadas en el mismo para garantizar su validez técnica.

Para aquellos métodos ISO, la validación incluye el estudio de: a) recuperación (o exactitud): el grado de concordancia entre el resultado obtenido con el método en estudio y el valor de referencia y b) reproducibilidad (o precisión), como una medida de la concordancia o el grado de similitud obtenido al realizar el mismo proceso en el que se ha introducido variabilidad en las condiciones establecidas.<sup>15</sup> La validación de métodos alternativos es mucho más extensa y tomamos como referencia en este trabajo la validación realizada por AFNOR<sup>16</sup> sobre la que ampliamos o completamos aspectos que creemos relevantes para la realización de este trabajo detallados en el siguiente apartado.

### **3 Antecedentes y justificación del trabajo**

La situación actual respecto a indicadores microbiológicos en piscinas está regulada por el Real Decreto 742/2013, de 27 de septiembre<sup>17</sup>, que regula todo lo referido a los criterios técnico-sanitarios que deben cumplir las piscinas.

Anteriormente la única normativa a nivel estatal referida a piscinas era la Orden de 31 de mayo de 1960<sup>18</sup> sobre piscinas públicas complementada por la Orden de 12 de julio de 1961<sup>19</sup>; derogadas tras la entrada en vigor del Real Decreto 742/2013.

Esta última Orden presenta los siguientes valores paramétricos de indicadores microbiológicos:

“La cantidad de bacterias por centímetro cúbico en muestra de agua tomada de cualquier lugar de la piscina y cultivada en agar a 37 grados durante veinticuatro horas no pasará de las 100 colonias en condiciones normales y de 200 en los momentos de máxima concurrencia. El bacilo coli de tipo fecal no debe hallarse en dos de cada cinco muestras de cinco centímetros cúbicos cada una, tomadas en el mismo día y en momento que la piscina se halle en uso”.

No existía un valor definido exclusivamente para *Pseudomonas aeruginosa*, encontrándose ésta englobada en el recuento general de bacterias.

Esta situación cambia con la instauración de decretos autonómicos en las diferentes comunidades, siendo el Decreto 255/1994, de 7 de diciembre, del Gobierno Valenciano<sup>20</sup>, por el que se regulan las normas higiénico-sanitarias y de seguridad de las piscinas de uso colectivo y de los parques acuáticos, el primer documento oficial en la Comunidad Valenciana que determina la obligatoriedad de ausencia de *P. aeruginosa* en 100 mL de muestra de piscina analizada.

El Real Decreto 742/2013<sup>17</sup> exige, al igual que el Decreto 255/1994<sup>20</sup>, un valor paramétrico de 0 ufc (unidades formadoras de colonias) o NMP (número más probable) en 100 mL.

El método actual para la detección y recuento de *P. aeruginosa* en aguas es la filtración a través de membrana e incubación en cualquier medio de cultivo de los reflejados en UNE EN-ISO 16266:2008.<sup>21</sup>

El tiempo requerido para obtener el resultado es de 48 h, siempre que las colonias desarrolladas muestren una pigmentación verde/azul (debido a la piocianina). Solo en este caso son contadas como *Pseudomonas aeruginosa*.

Los casos en que haya presencia de colonias no productoras de piocianina y den lugar a fluorescencia bajo radiación UV, así como los casos en que produzcan una pigmentación marrón rojiza, no den lugar a fluorescencia y sean oxidasa positivas se han de considerar presuntivas y es necesaria una identificación que prolongará la confirmación al menos 24 horas más, siempre que la colonia se encuentre aislada. En el caso de tener que aislarla el proceso se prolongará 48 horas más hasta su crecimiento, necesarias para el aislamiento.

Un 10% de las colonias presuntivas son confirmadas (como mínimo 5 colonias) mediante diferentes procesos de confirmación metabólica: morfología y tinción, junto a reacción de la oxidasa, comprobación de pigmentos, hidrólisis de la caseína y cultivo en caldo acetamida; o mediante galería bioquímica o PCR.

El motivo de la realización de esta validación del método de detección de *Pseudomonas aeruginosa* en agua de piscina o spa frente al método de referencia establecido en la norma UNE-EN ISO 16266:2008<sup>21</sup> es la búsqueda de un método más rápido y selectivo. Para ello utilizamos el método Pseudalert® de la casa comercial IDEXX, que comercializa diversos reactivos para la identificación de microorganismos patógenos en aguas, entre los cuales destaca

Colilert®, con más de 20 años en el mercado, para la detección de coliformes totales y *E. coli* en agua.

El método Pseudalert® se basa en tecnología de detección de enzimas bacterianas que señala la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* por medio de la hidrólisis de un sustrato aminopeptidasa cumarínico contenido en el reactivo de Pseudalert®.<sup>22</sup> Las células crecen con rapidez gracias al aporte de vitaminas, aminoácidos y otros nutrientes del reactivo. Las células en crecimiento poseen una enzima capaz de hidrolizar el sustrato presente en el reactivo y producir fluorescencia azul cuando se expone a luz UV. Este método permite detectar *Pseudomonas aeruginosa* en 24 h, sin pasos de confirmación adicionales y con un manejo más sencillo respecto al método de referencia.<sup>23</sup>

	Día 0 (recepción de la muestra)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
<b>Pseudalert®</b>	Preparación de la muestra e incubación	Lectura <b>RESULTADO</b>				
<b>Cetrimida</b>	Filtración de la muestra e incubación	incubación de la muestra	Lectura <b>RESULTADO</b>			
<b>Aislamiento muestra</b>			resiembrado de colonia para crecimiento aislado e incubación	incubación de la muestra	Lectura <b>RESULTADO</b>	
<b>Confirmación PCR</b>					Preparación de la muestra Lectura <b>RESULTADO</b>	
<b>Confirmación galería bioquímica</b>					Preparación de la muestra e incubación	Lectura <b>RESULTADO</b>

Tabla 1. Comparativa de los tiempos de análisis de *P. aeruginosa* aplicando el método Pseudalert® y el método ISO seguido de las posibles confirmaciones

La reducción del tiempo para la obtención de resultados puede crear una gran diferencia en situaciones tales como durante los meses estivales, en los que las

piscinas están en uso y la demanda de análisis es alta: el trabajo de laboratorio se agilizaría, se consumirían menos recursos y se generarían menos residuos. Este método también permitiría detectar con antelación aquellas piscinas que no cumplan los criterios establecidos, evitando de forma más temprana la exposición de los bañistas a situaciones consideradas insalubres; y en aquellas piscinas que han sido cerradas por sospecha, la obtención de los resultados en menor tiempo hará que permanezcan menos tiempo cerradas. Este ahorro de tiempo será notable en aquellas muestras en las que a partir del crecimiento en placas es necesario realizar confirmación.

Actualmente existe una validación realizada por AFNOR<sup>16</sup> para IDEXX (fabricante de Pseudalert®). Esta validación realizada está basado exclusivamente en muestras de agua que no presentan contaminación por *P. aeruginosa*, siendo contaminadas artificialmente, es por eso que en este trabajo, además de realizarlo con muestras contaminadas artificialmente, también se ha realizado con muestras de agua de piscina que presentaban contaminación de *P. aeruginosa* cuando llegaron al laboratorio, trabajando así con muestras plenamente representativas del material que es recibido y analizado en el laboratorio.

#### 4 Objetivos

El objetivo principal de este proyecto es la validación del método de detección y cuantificación de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras ambientales mediante el sistema comercial Pseudalert®.

La validación incluye, entre otros parámetros, el estudio de la especificidad, reproducibilidad y recuperación respecto al método de referencia usado en el laboratorio donde se ha realizado este trabajo (Departamento de Microbiología de LABAQUA), basado en la norma ISO 16266:2008.<sup>21</sup> El medio de cultivo escogido es agar cetrimida.

En paralelo a la validación, se realizará un estudio de presencia de este microorganismo patógeno oportunista en ambientes susceptibles de ser foco de transmisión de la bacteria, principalmente piscinas y playas, utilizando el nuevo método a validar.

## 5 Material y métodos

### 5.1 Cepas de referencia

Para comprobar la recuperación, reproducibilidad y selectividad en el método de detección se inocularon las muestras con cepas de *P. aeruginosa* empleando material de referencia microbiológico certificado cuantitativo provisto por IELAB en forma de pastilla liofilizada. Estas pastillas contienen un determinado número de ufc, obtenido por el fabricante siguiendo las condiciones de ensayo específicas en el Certificado de Análisis. El uso de este método de referencia facilita mucho el trabajo que permite disponer de una forma muy sencilla de una suspensión de la bacteria con una concentración conocida. Con esto se evita tener que titular las suspensiones, sin embargo, se necesitaron valores de ufc muy superiores a los proporcionados en las pastillas, por lo que se optó por resemar las colonias obtenidas por las pastillas y multiplicar así su número.

IELAB S.L., filial de la empresa LABAQUA S.A., presta servicios y productos para la aplicación de la Calidad en los laboratorios de ensayo. Cuenta con el certificado de la norma UNE-EN ISO 9001:2015<sup>24</sup>, "Sistemas de gestión de la calidad: requisitos". Desde 2004 presenta la acreditación como Productor de Material de Referencia según UNE-EN ISO 17034:2017<sup>25</sup>, con el número de expediente 01/PMR001.

Las cepas usadas fueron:

Cepa	Trazabilidad	Lote IELAB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT 108	ATCC 27853	PPA07116
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT 110	ATCC 10145	PPA30017
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT 111	ATCC 9027	PPA13027
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CECT 378	ATCC 13525	PPF03027
<i>Escherichia coli</i> CECT 434	ATCC 25922	PEC22037
<i>Enterococcus faecalis</i> CECT 481	ATCC 19433	PEFc10088

Tabla 2. Cepas utilizadas en el trabajo.

### 5.2 Aislados ambientales

En adición a las cepas de *P. aeruginosa* de referencia suministradas por IELAB, anteriormente mencionadas, cuatro cepas fueron obtenidas a partir de muestras

de agua recibidas de clientes y analizadas previamente en el laboratorio mediante cultivo en agar cetrimida. Estos aislados fueron confirmados mediante galería miniaturizada de pruebas bioquímicas BBL™ Crystal™ (Becton Dickinson), teniendo en cuenta las pautas descritas por el procedimiento de ensayo A-E-PE-0050.<sup>26</sup>

### 5.3 Medios de cultivo

#### - Caldo nutritivo con ácido bórico

En la elaboración de los títulos se utilizó caldo nutritivo con ácido bórico para la elaboración de las diluciones.

Fórmula	g/l
Caldo nutritivo nº 2	25
Ácido bórico	18

Tabla 3. Composición de caldo nutritivo con ácido bórico.

Siguiendo las instrucciones del fabricante se añadieron 25 g de liofilizado de caldo nutritivo nº 2 en 1 L de agua y se agitó hasta su disolución, esterilizado posteriormente en autoclave a  $121\pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Finalmente se adicionaron 18 g de ácido bórico a la mezcla ya realizada.

#### -Agua de peptona 1g

Para la extracción de los microorganismos existentes en las muestras de arena según lo descrito en A-PE-0036.<sup>27</sup>

Fórmula	g/l
Peptona	1
NaCl	8,5

Tabla 4. Composición de agua de peptona.

#### -Agar cetrimida

El medio de cultivo utilizado para la validación ha sido agar cetrimida para el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, descrito en el procedimiento de la norma ISO 16266:2008.<sup>21</sup> Este medio es usado como referencia frente a Pseudalert®.

Fórmula	g/l
Peptona de gelatina	20.00
Cloruro de magnesio	1.4
Sulfato de potasio	10.00
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio	0.3
Agar	13.60
pH	7.2 ±0.2

Tabla 5. Composición del medio agar cetrimida.

Como se encuentra descrito en el procedimiento de ensayo A-E-PE-0007<sup>28</sup>, seguimos las instrucciones del fabricante: se mezclaron 45,3 g del medio liofilizado en 1 L de agua destilada a la que se añadieron 10 mL de glicerina; llevado a ebullición hasta disolución completa y distribuido en recipientes adecuados para después esterilizar durante 15 minutos a 121±3°C.

Las placas así preparadas pueden conservarse en condiciones refrigeradas y protegidas de la luz, según se especifica en el A-E-PE-0022.<sup>29</sup>

#### -Agar tergitol 7

Para el cultivo de *Escherichia coli*, siguiendo las directrices de A-E-PE-0061<sup>30</sup> fue usado el medio agar tergitol 7.

Formula	g/l
Peptona de carne	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	6
Lactosa	20
Tergitol	70.1
Azul de bromotimol	0.05
Agar bacteriológico	10
Ph	7.2 ± 0.2

Tabla 6. Composición del medio agar tergitol 7.

El medio deshidratado se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y descritas en el procedimiento de trabajo A-E-PE-0061<sup>30</sup>, se disolvió por calor hasta ebullición 51,1 g de polvo deshidratado en 1 L de agua, posteriormente se esterilizó en autoclave a 121±3°C durante 15 minutos e introducir en baño maría a una temperatura de 45±1°C hasta que el medio alcance dicha temperatura.

Posteriormente fue añadido  $1000 \pm 20$   $\mu\text{L}$  de una solución acuosa estéril de 2,3,5, tricoloruro de trifenil tetrazolio al 1% con micropipeta y se mezcló bien. Fue distribuir en placas de Petri y dejado solidificar. El espesor del medio en las placas debe ser como mínimo de 5 mm.

Las placas así preparadas pueden conservarse en condiciones refrigeradas y protegidas de la luz, según se especifica en el A-E-PE-0022.<sup>29</sup>

#### **-Agar Slanetz Bartley**

Para el crecimiento de *Enterococcus faecalis* se utilizó agar Slanetz Bartley siguiendo los procedimientos reflejados en A-E-PE-0013.<sup>31</sup>

<b>Formula</b>	<b>g/l</b>
Triptosa	20
Extracto de levadura	5
Dextrosa	2
Fosfato dipotasico	4
Azida sódica	0.4
Agar	12
Ph	$72. \pm 0.1$

Tabla 7. Composición del medio agar Slanetz Bartley.

Se preparó siguiendo las instrucciones suministradas por el proveedor (Identificado en el registro de control de calidad de medios de cultivo) y en el documento A-E-PE-0013.<sup>31</sup> Se disolvió por calor hasta ebullición 43,4 g en 1 L de agua. A continuación, se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$ , dejando atemperar hasta  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  en baño maría hasta que el medio alcanzó dicha temperatura y se añadió 10 mL/L de una solución estéril de TTC al 1%. Posteriormente fue distribuido en las placas de Petri y dejado solidificar. Las placas así preparadas pueden conservarse en condiciones refrigeradas y protegidas de la luz y la deshidratación, según lo establecido en el A-E-PE-0022.<sup>29</sup>

#### 5.4 Kit Pseudalert®

Para la identificación con el método a evaluar se utilizó el reactivo de kit Pseudalert® para muestras de agua de 100 mL (comercializado por IDEXX). El kit cuenta con preparaciones individuales con el contenido adecuado de reactivo

(dosis Snap) y blísteres con 49 pocillos grandes y 48 pocillos pequeños (Quanti-Tray®/2000) donde se vertió la muestra mezclada con la dosis Snap del reactivo, teniendo que usar para su sellado la selladora Quanti-Tray® Sealer. En este trabajo fueron usados los lotes KM210, MM322, CN324, HN818 del reactivo Pseudalert.



Figura 1. Dosis de reactivo Pseudalert® y blíster Quanti-Tray®/2000.



Figura 2. Selladora Quanti-Tray® Sealer.

## 5.5 Procedencia de las muestras empleadas en la validación.

### 5.5.1 Muestras de agua de piscina

Para la validación del método Pseudalert® se emplearon 47 muestras representativas de las muestras ambientales que se reciben habitualmente para analizar en el laboratorio de microbiología de LABAQUA. Las muestras ideales son aguas de piscina, recibidas en el laboratorio, susceptibles de presentar contaminación por *Pseudomonas aeruginosa*. Aquellas muestras en las que tras

ser analizadas no se observó presencia del microorganismo se usaron como matrices a inocular ya que reproducen las condiciones ambientales de las muestras ambientales positivas.

Las muestras de agua fueron tomadas en su punto de origen por personal técnico de LABAQUA en envases estériles con tiosulfato sódico (24 mg/L) para la neutralización del cloro presente en el agua.

### 5.5.2 Muestras de arena de playa

Las muestras de arena fueron recogidas en distintas playas de la provincia de Alicante: Playa Muchavista de San Juan de Alicante, Cala Almadraba de Alicante, Playa de la Albufereta de Alicante y diferentes calas de la Albufereta de Alicante (Figura 3, Figura 4).



*Figura 3. Puntos de recogida de muestras de arena de playa para la validación y el estudio ambiental. 1,2 Calas de la Albufereta Alicante; 3,4,5 Playa de la Albufereta, Alicante; 6,7 Cala Almadraba, Alicante.*

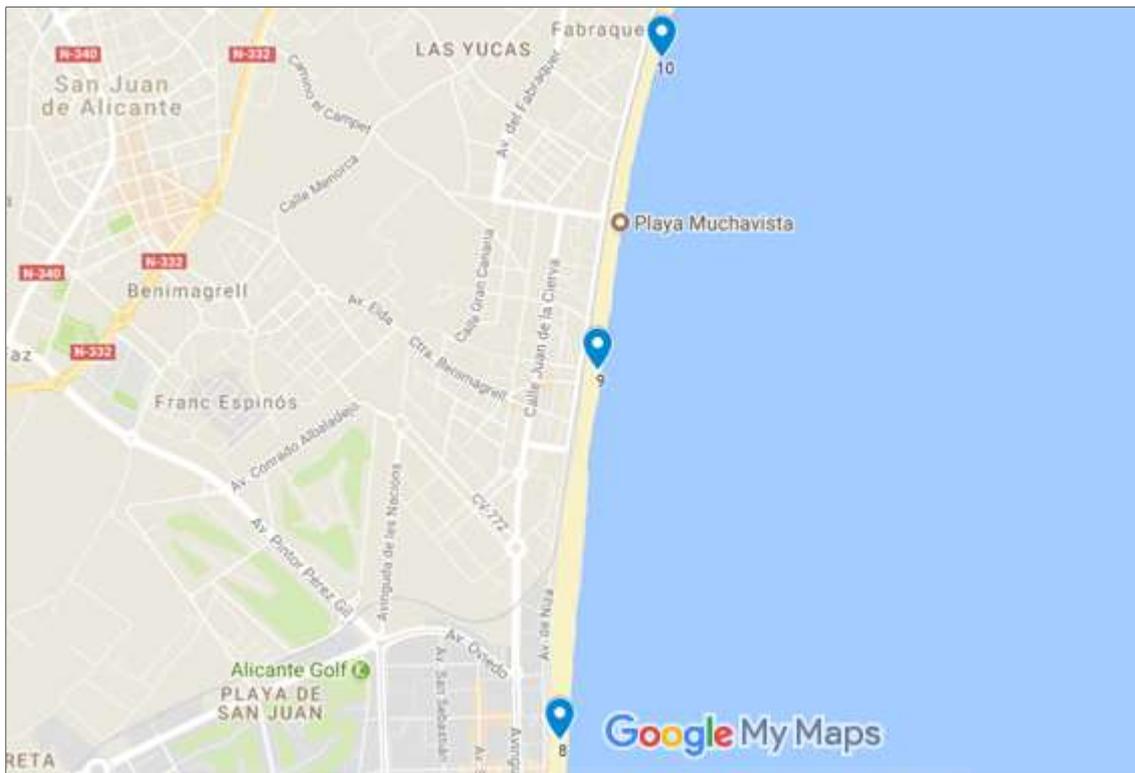


Figura 4. Puntos de recogida de muestras de arena de playa para la validación y el estudio ambiental. 8, 9, 10, Playa Muchavista, San Juan de Alicante.

Las 31 muestras de arena de playa utilizadas para el trabajo fueron obtenidas exclusivamente para la realización de esta validación, recogidas en botes estériles de 100 mL en zonas de arena húmeda cercanas a la orilla que no estuvieran en contacto con agua de mar.

Estas muestras fueron analizadas para comprobar ausencia de *P. aeruginosa* y ser posteriormente inoculadas con las cepas de referencia y los aislados ambientales.

#### 5.6 Procedencia de las muestras empleadas en el estudio ambiental.

Las muestras obtenidas fueron sometidas a un estudio que consistió en la detección y cuantificación de *P. aeruginosa*, aquellas muestras que mostraron presencia de *P. aeruginosa* fueron utilizadas para el estudio ambiental.

Las muestras usadas para el estudio ambiental procedieron de agua de piscina y de arena de playa. El procedimiento para la obtención de muestras de agua de piscina y de arena de playa es idéntico al reflejado en el apartado anterior. Las

muestras de arena comparten origen con las muestras de arena detalladas en el apartado anterior.

## 5.7 Preparación de inóculos y muestras

En la preparación de las muestras para la validación debieron prepararse y cuantificar los inóculos de las cepas de referencia y aislados ambientales a usar. Las cepas de referencia, suministradas por IELAB, fueron recibidas en forma de pastilla liofilizada y tuvieron que ser rehidratadas antes de su utilización. Siguiendo las instrucciones del proveedor, en un tubo estéril se vertió 20 mL de agua estéril y seguidamente se añadió la pastilla liofilizada para su reconstitución, se disuelve durante 10 minutos a temperatura ambiente, agitando suavemente cada 2 minutos aproximadamente.

Debido a la escasa concentración de ufc en las pastillas las células de éstas fueron resembradas en placa para obtener un mayor número de ufc disponibles. Las cepas referencia resembradas y aquellas cepas que fueron aisladas de muestras ambientales positivas se encontraban cultivadas en placas. De estas placas se recuperó todo el material biológico y se suspendió en 20 mL de caldo nutritivo con ácido bórico, formando la solución madre para realizar la titulación que permitiera la cuantificación de ufc.

### 5.7.1 Titulación de los inóculos

La titulación de los inóculos se realizó mediante una serie de diluciones decimales seriadas a partir de la suspensión madre de las cepas de referencia y de los aislados ambientales. De cada una de estas diluciones se filtró a través de membrana 1 mL por duplicado y se incubó la membrana sobre el medio sólido correspondiente. Los títulos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* fueron incubados a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 48 h, *Escherichia coli* a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  24 h y *Pseudomonas fluorescens* a  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 48 h.

Mediante la lectura de las placas incubadas conocimos el número de ufc de cada una de las diluciones. Normalmente las ideales para trabajar son las diluciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  o  $10^{-8}$ . De acuerdo con el recuento obtenido en las diferentes diluciones se calculó el volumen necesario para inocular la concentración deseada en las muestras de validación.

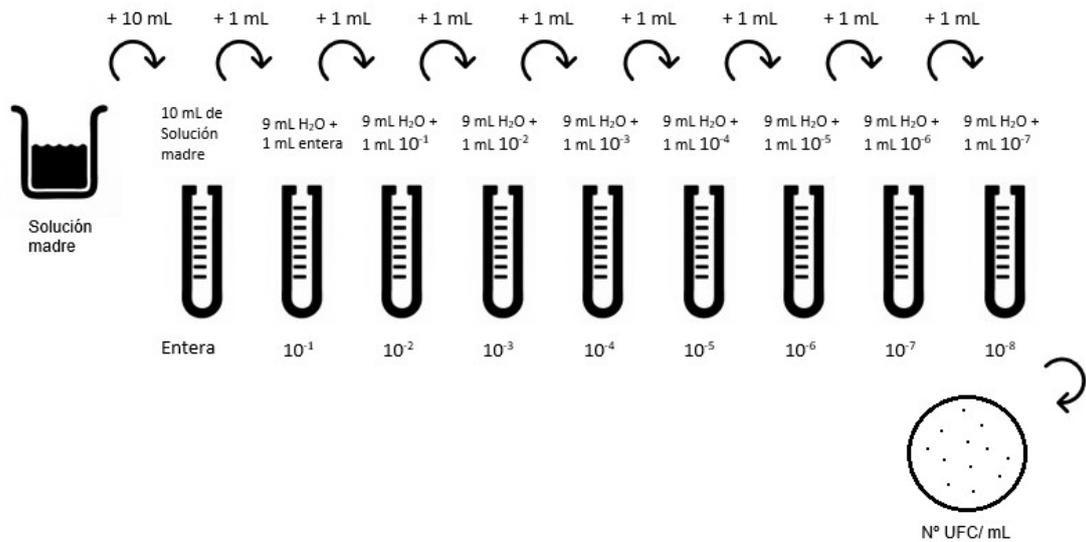


Figura 5. Representación de la titulación de los inóculos suministrados a las muestras.

### 5.7.2 Preparación de las muestras

El volumen de las muestras fue de 300 mL, en un frasco estéril de 500 mL, dividida posteriormente en tres alícuotas de 100 mL; dos de ellas dirigidas al análisis por duplicado de Pseudalert®, y una reservada para la filtración a través membrana.

Aquellas matrices que presentaban ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* fueron inoculadas con la concentración deseada, del mismo modo que con los interferentes.

En las muestras ambientales en las que se sospechaba una contaminación importante, además de analizar la muestra, se realizaron diluciones decimales seriadas, empleando como diluyente agua estéril según lo indicado en A-E-PE-0031.<sup>32</sup>

## 5.8 Procesado de las muestras

### 5.8.1 Filtrado e incubación

Utilizando pinzas esterilizadas a la llama, se colocó un filtro de membrana de celulosa estéril de 0,45µm sobre el soporte de filtración, al que posteriormente se coloca un embudo de plástico estéril. Se homogenizó la muestra mediante agitación y se filtró por vacío. Posteriormente se retiró el embudo, y con las

pinzas esterilizadas a la llama se transfirió la membrana sobre el medio de cultivo de agar selectivo localizado en una placa de Petri, colocando la superficie de filtración hacia arriba. La placa, cerrada e invertida, se incubó a la temperatura correspondiente. Todos los elementos usados para el filtrado fueron estériles. Se filtraron a través de membrana 100 mL por duplicado para el análisis de las muestras, incubándose las membranas dispuestas sobre agar cetrimida a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 48 h siguiendo las pautas descritas por el procedimiento de ensayo A-E-PE-0007.<sup>28</sup>

#### 5.8.1.1 Preparación Quanti-Tray/2000 e incubación

En un vaso estéril que contiene una alícuota de 100 mL se añadió el reactivo proporcionado por IDEXX. Tras cerrar el vaso, se agitó hasta su disolución. Una vez disuelto se vertió la mezcla de muestra con reactivo en el blíster Quanti-Tray/2000 y se selló usando un Quanti-Tray Sealer. Posteriormente fue incubado a  $38\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 24 h, como indica la información aportada por IDEXX.<sup>33</sup> Los análisis de las muestras con Pseudalert® se realizaron por duplicado con distintos lotes e incubados en diferentes estufas, con la finalidad de incluir una fuente de variabilidad.

#### 5.8.2 Procesado de las muestras de la arena de playa

Para realizar la extracción de la microbiota presente en las muestras y transferirlas a una fase líquida se siguió lo indicado en la norma UNE-EN ISO 6887-1:2017<sup>34</sup> y el procedimiento de ensayo A-E-PE-0036.<sup>27</sup>

Se pesaron 25 g de muestra de arena, a los que se añadieron 225 mL de peptona tamponada estéril (1g/l). Una vez homogeneizada la mezcla con agitación vigorosa, se decantó hasta que la fase sólida y acuosa se separaron y esta última se presentó lo más translúcida posible, no dejando reposar en ningún caso más de media hora.

La fase acuosa donde se encuentran los microorganismos fue recuperada y se eliminó el resto sólido. Esta solución fue tratada como una muestra de agua a la hora de ser analizada.

### 5.8.3 Lectura de resultados y confirmación

Terminado el tiempo de incubación se realizó la lectura de los resultados: el número de ufc presuntivas desarrolladas en las placas de medio agar cetrimida y la lectura de la fluorescencia en los pocillos de Pseudalert®.

#### 5.8.3.1 Lectura de resultados y confirmación de agar cetrimida

En el recuento en las placas de agar cetrimida se siguieron las indicaciones reflejadas en el procedimiento de ensayo A-E-PE-0007.<sup>28</sup> Se tomaron como colonias presuntivas aquellas que presentaban una morfología redonda, de superficie lisa, brillante, color blanco cremoso a verdoso y aspecto mucoso; y debido a la difusión de pigmento el medio o la membrana adquiría un tono verdoso.



*Figura 6. Filtro de celulosa con la apariencia verdosa característica del crecimiento de P. aeruginosa (izquierda). Fluorescencia emitida por P. aeruginosa cuando se expone a luz ultravioleta (derecha).*

La lectura de los resultados mostrados por las placas fue determinada mediante el examen de las colonias aparecidas sobre la membrana. En los casos en que fue necesaria una confirmación (cuando haya presencia de colonias no productoras de piocianina y den lugar a fluorescencia bajo radiación UV, así como los casos en que produzcan una pigmentación marrón rojiza, no den lugar a fluorescencia y sean oxidasa positivas se han de considerar presuntivas) se realizaron los procedimientos de PCR o galería bioquímica BBL™ Crystal™ (Becton Dickinson).

En aquellas muestras en las que se realizaron diluciones, el resultado del recuento de colonias se multiplicó por el factor de dilución correspondiente.

a) Confirmación por PCR

La confirmación por PCR se realizó siguiendo para ello el procedimiento A-E-PE-0012.<sup>35</sup> Se preparó una suspensión de células, para ello se picaron las colonias presuntivas y se depositaron en un tubo eppendorf junto a 200 µL de CHELEX 100 al 20% para causar la lisis celular y así extraer el ADN a analizar. Fue sometido a tres ciclos alternativos de calor a 94°C y frío a -20°C de una duración de 10 minutos cada uno. Para la confirmación de las colonias presuntivas en agar cetrimida por PCR se utilizaron como cebadores:

**FORWARD: 5'-gACAACgCCCTCAgCATCACCAgC-3'**

**REVERSE:5'-CgCTggCCCATTCgCTCCAgCgCT-3'**

Estos cebadores pertenecen al gen que codifica la exotoxina A de *P. aeruginosa*.<sup>36</sup>

La composición de la mezcla de reacción de esta PCR se muestra en la Tabla 8.

Reactivos	1x Muestra
Buffer de PCR 2x	4 µL
MgCl <sub>2</sub> 3mM	1.2 µL
dNTPs 0.4 mM	0.3 µL
Cebador forward 1µM	0.2 µL
Cebador reverse 1 µM	0.2 µL
Patron interno	0.8 µL
H <sub>2</sub> O	31.1 µL
Taq polimerasa 5U/100 µL	0.2 µL
Total	38 µL

Tabla 8. Concentraciones y volúmenes utilizados en las PCRs.

A estos 38µL que componen la mezcla de reacción de la PCR se le adicionaron 2µL del ADN extraído de la muestra a analizar, también se adicionaron 2µL de agua estéril a 38µL de mezcla de reacción para la elaboración de un control negativo, repitiendo este proceso con 2µL de ADN diana para obtener el control positivo. Los diferentes tubos que contienen las mezclas detalladas se colocaron en el termociclador, haciéndolo en el programa de ciclos para esta reacción de PCR, mostrado en la Tabla 9.

Fases	Temperaturas	Tiempo
Desnaturalización	94°C	4 min
Unión de los cebadores (x35 ciclos)	94°C	30 seg
	62°C	30 seg
	72°C	1 min
Elongación	72°C	10 min

Tabla 9. Programa utilizado para la confirmación de *P. aeruginosa* mediante PCR.

Tras la realización de los tres ciclos alternativos de calor y frío el resultado de la amplificación por PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% siguiendo las indicaciones en A-E-EP-0009.<sup>37</sup>

Fórmula	Cantidad para 150ml (1 placa)
agarosa	1.8± 0,2 g
tampón 10X (diluido 1:10)	150 mL
solución de tinción de ácidos nucleicos Red Safe	7,5µL

Tabla 10. Composición de gel de agarosa.

Para realizar la electroforesis, se colocaron 10µL de patrón de peso molecular, en el primer pocillo del gel, en los siguientes pocillos se colocó un control positivo y un control negativo. Para preparar las muestras se depositaron gotas de aproximadamente 3-5µL de tampón de carga en un papel de parafina, a cada gota se adicionaron 10µL de muestra, se homogeneizó y colocó con cuidado en el pocillo correspondiente del gel.

Este gel con la muestra se encontraba horizontalmente sumergido en una cubeta llena de tampón de electroforesis. Al aplicar un campo eléctrico, el ADN de la muestra migró por el gel hacia el polo positivo según su peso molecular, la concentración de agarosa, la conformación del ADN y la corriente aplicada. Como último paso, el gel puede teñirse con una de tinción de ácidos nucleicos que va a permitir visualizar las bandas de ADN sobre un transiluminador de luz ultravioleta, observándose una banda de amplificación de 396 pb para las muestras positivas, y una banda de 650 pb correspondiente a la amplificación de ADN del patrón interno.<sup>36</sup>

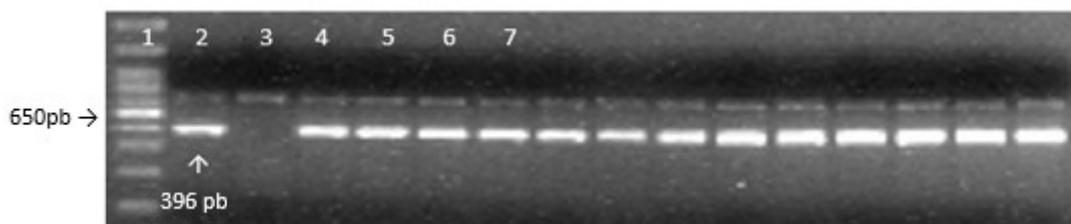


Figura 7. Gel de electroforesis de colonias presuntivas. 1: Patrón de peso molecular. 2: control positivo de PCR. 3: Control negativo de PCR. 4,5,6,7: Muestras positivas.

#### b) Confirmación por galería bioquímica

La confirmación mediante galería bioquímica se realizó con el sistema BBL™ Crystal™ (Becton Dickinson) de identificación para bacterias entéricas/no fermentadoras siguiendo el procedimiento descrito por el procedimiento de ensayo A-E-PE-0050.<sup>26</sup>

Con una torunda estéril de algodón se tomó una colonia aislada y se suspendió en un tubo de fluido de inóculo BD BBL™ Crystal™ (Becton Dickinson) para organismos entéricos, tras lo cual se somete a agitación para homogeneizar. Se vertió el contenido en el área señalada de la base y fue repartido por la placa hasta completar todos los pocillos. Se colocó la tapa, en la que se encuentran los sustratos para las reacciones que determinarán el microorganismo.

Se incubó durante 20h a una temperatura de 37°C. Tras este periodo se observaron diferentes colores en los pocillos. Con la ayuda del material facilitado por el fabricante se da un valor a cada pocillo, obteniéndose el perfil que identificó a la muestra. Este perfil se cotejó con una base de datos para la identificación.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	ARA (-)	MNS (-/+)	SUC (-)	MEL (-)	RHA (-)	SOR (-)	MNT (-)	ADO (-)	GAL (+)	INO (-)
2	PHO (-/+)	BGL (-)	NPG (-)	PRO (+)	BPH (-)	BXY (-)	AAR (-)	PHC (-/+)	GLR (-)	NAG (-)
1	GGL (+)	ESC (-)	PHE (-)	URE (+)	GLY (+)	CIT (+)	MLO (+)	TTC (+)	ARG (+)	LYS (-/+)
Perfil	1/3	0/4	0	3	1	1	1	1/3	5	0/1

Tabla 11. Ejemplo de código de perfil para la cepa de control de calidad *P. aeruginosa* ATCC 35032.



Figura 8. Galería bioquímica positiva para *P. aeruginosa*.

### 5.8.3.2 Lectura de resultados y confirmación de Pseudalert®

Los resultados de Pseudalert® se interpretaron, una vez pasado el tiempo de incubación, depositando los blísteres bajo luz ultravioleta para poder observar el número de pocillos que mostraban fluorescencia. En cada blíster encontramos 49 pocillos grandes y 48 pequeños en los cuales se alojó la muestra vertida en el blíster, el contenido de cada uno de los pocillos podía mostrar o no fluorescencia. Una vez contados los pocillos que emitían fluorescencia se buscó el valor de NMP que representan en una tabla de dos ejes (uno para el número de pocillos grandes y otro para los pocillos pequeños) proporcionada por el fabricante, disponible en los anexos.



Figura 9. Blísteres Quanti-Tray®/2000 bajo luz UV mostrando diferentes grados de fluorescencia.

## 5.9 Metodología de la validación

### 5.9.1 Recuperación

Para el análisis de recuperación se calculó la recuperación relativa de Pseudalert® con respecto al medio de referencia agar cetrimida, considerando el número de ufc/100mL obtenido en agar cetrimida como el 100%, según UNE-EN ISO 13843.<sup>38</sup>

### 5.9.2 Reproducibilidad

Para el cálculo de la reproducibilidad se emplearon los resultados las diferentes muestras por duplicado. Las muestras fueron analizadas según las recomendaciones de la norma ISO/TS 19036:2006.<sup>39</sup> El análisis se realizó por, en días distintos y con lotes de medios y materiales distintos para incluir posibles fuentes de variabilidad.

## 6 Resultados y discusión

### 6.1 Validación

Los datos obtenidos de recuperación y precisión (reproducibilidad) se exponen en las tablas 12 y 13. En la tabla, localizada en el anexo, se observa un resumen de todos los cálculos obtenidos, el origen de las muestras y las tablas al completo con los cálculos realizados.

#### 6.1.1 Recuperación relativa

La recuperación relativa se calculó a partir de la comparación de la misma muestra analizada en paralelo con los dos métodos como se mencionó en el apartado 4.8. Los resultados obtenidos en cada método se convirtieron a logaritmos, aplicándoles la fórmula de la recuperación, mencionada más adelante. Se comparó el método Pseudalert® frente al medio de referencia, medio agar cetrimida. Dado que de cada muestra se disponía de resultados duplicados de Pseudalert® para el cálculo de la recuperación no se utilizó el promedio de estos dos valores, sino que se seleccionó el valor más desfavorable de cada pareja de datos para realizar el cálculo de la recuperación, tal y como se especifica en la norma UNE-EN ISO 13843:2017.<sup>38</sup>

Previamente a la realización de los cálculos fueron excluidos de los datos a analizar aquellos datos de ambos métodos de detección que excedieran el límite superior de detección (aquellas placas que mostraron un crecimiento incontable y aquellos blísteres que mostraron fluorescencia en todos sus pocillos, y aquellos en los que uno o ambos métodos tuvieran un valor de cero.

En el cálculo de la recuperación relativa de las muestras de agua de piscina contamos con los datos de las muestras que presentaban contaminación ambiental más aquellas muestras que han sido inoculadas.

De 74 análisis realizados, 2 fueron descartados por un fallo producido por la selladora Quanti-Tray® Sealer, 26 muestras fueron descartadas por exceder el límite superior de detección también se eliminaron las muestras que mostraron un resultado negativo en uno o ambos métodos.

En las tablas mostradas a continuación se muestran los recuentos correspondientes a 100 mL de muestra analizada, en agua de piscina y 25 g de arena de playa, así como los valores logarítmicos, necesarios para el cálculo de la recuperación:

- **Log ufc ó NMP/100 mL** = logaritmo en base 10 del número de ufc ó NMP/100 mL obtenido en Pseudalert®, con respecto al medio agar cetrimida.
- **Δ Log ufc ó NMP /100 mL** = diferencia entre Log Pseudalert® y Log medio agar cetrimida.
- **Media (Δ Log ufc ó NMP /100 mL)** = media aritmética del total de valores de Δ Log ufc ó NMP /100 mL
- **Sd (Δ Log ufc ó NMP /100 mL)** = desviación estándar del total de valores de Δ Log ufc ó NMP /100 mL
- **% Rec:** porcentaje de recuperación
- **% Rec = 10 - Δ Log ufc ó NMP /mL x 100**

Muestra	Resultado Pseudalert® (NMP/mL)	Referencia Cetrimida (ufc/mL)	Log Vres	Log Vref	Dif INTER (Log VreS - LogVref)	Media (DifInter)	Sd (DifInter)
1	155,3	190	2,191	2,279	-0,088		
2	387,3	300	2,588	2,477	0,111	0,008	0,377
3	260,3	150	2,415	2,176	0,239	0,008	
4	579,4	300	2,763	2,477	0,286		

5	517,2	340	2,714	2,531	0,182	n =	46
6	686,7	310	2,837	2,491	0,345	% Rec =	101,81375
7	20,3	22	1,307	1,342	-0,035		
8	35	25	1,544	1,398	0,146		
9	23,5	18	1,371	1,255	0,116		
10	48	51	1,681	1,708	-0,026		
11	71,2	60	1,852	1,778	0,074		
12	47,1	67	1,673	1,826	-0,153		
13	11	22	1,041	1,342	-0,301		
14	235,9	170	2,373	2,230	0,142		
15	980,4	250	2,991	2,398	0,593		
16	290,9	190	2,464	2,279	0,185		
17	148,3	120	2,171	2,079	0,092		
18	38,4	35	1,584	1,544	0,040		
19	547,5	330	2,738	2,519	0,220		
20	172,5	320	2,237	2,505	-0,268		
21	5,2	32	0,716	1,505	-0,789		
22	579,4	390	2,763	2,591	0,172		
23	25,9	15	1,413	1,176	0,237		
24	11,9	15	1,076	1,176	-0,101		
25	20,1	16	1,303	1,204	0,099		
26	18,7	33	1,272	1,519	-0,247		
27	47,9	60	1,680	1,778	-0,098		
28	6,3	18	0,799	1,255	-0,456		
29	5,2	62	0,716	1,792	-1,076		
30	7,4	11	0,869	1,041	-0,172		
31	3,1	58	0,491	1,763	-1,272		
32	5,2	2	0,716	0,301	0,415		
33	26,6	5	1,425	0,699	0,726		
34	31,3	12	1,496	1,079	0,416		
35	307,6	290	2,488	2,462	0,026		
36	93,4	52	1,970	1,716	0,254		
37	261,3	340	2,417	2,531	-0,114		
38	63,7	75	1,804	1,875	-0,071		
39	387,7	270	2,588	2,431	0,157		
40	240	142	2,380	2,152	0,228		
41	365,4	154	2,563	2,188	0,375		
42	193,5	107	2,287	2,029	0,257		
43	517,2	320	2,714	2,505	0,209		
44	214,3	290	2,331	2,462	-0,131		
45	6,3	22	0,799	1,342	-0,543		
46	307,6	340	2,488	2,531	-0,043		

Tabla 12: Recuperación obtenida en Pseudalert® para aguas de piscina.

Con las muestras de arena de playa inicialmente se realizaron 17 análisis de diferentes muestras en diferentes sesiones, de éstos solo 2 eran interpretables, ya fuera por exceder el límite de interpretación cualquiera de los dos métodos o por mostrar un resultado negativo. Debido a estos resultados inusuales de fluorescencia mostrados por el método Pseudalert® se procedió a autoclavar una serie de muestras de arena de playa, intentando conseguir una matriz lo más semejante a la muestra ambiental, pero con ausencia de organismos que pudieran ejercer interferencias, e inocularla posteriormente con el propósito de observar si se mostraba alguna variabilidad en los resultados sobre la que buscar una explicación a los datos de la fluorescencia mostrada en primer momento por las muestras sin autoclavar.

Se autoclavaron 11 muestras pudiéndose interpretar 9 de estas. Posteriormente se realizó otra sesión en la que se analizaron 12 muestras sin autoclavar, mostrando el mismo resultado errático observado en las primeras muestras analizadas.

Muestra	Resultado Pseudalert® (NMP/g)	Referencia Cetrimida (ufc/g)	Log Vres	Log Vref	Dif INTER (Log VreS - LogVref)	Media (DifInter)	Sd (DifInter)
1	7,38	4,95	0,868	0,695	0,173		
2	8,397	1,35	0,924	0,130	0,794	0,325	0,629
3	0,5675	1,98	-0,246	0,297	-0,543	0,325	
4	13,98	4,86	1,146	0,687	0,459		
5	8,154	2,7	0,911	0,431	0,480	n =	9
6	2,799	0,36	0,447	-0,444	0,891	% Rec =	211,41141
7	27,65	7,92	1,442	0,899	0,543		
8	14,18	1,53	1,152	0,185	0,967		
9	0,549	3,78	-0,260	0,577	-0,838		

Tabla 13. Recuperación obtenida en Pseudalert® para arenas de playa.

### 6.1.2 Reproducibilidad

Para los cálculos de la reproducibilidad se utilizaron los resultados duplicados de los recuentos en Pseudalert®, siguiendo las indicaciones recogidas en la norma ISO /TS 19036:2006.<sup>39</sup>

En las tablas 14 y 15 se recogen los valores de NMP/100 mL obtenidos en el recuento de las dos réplicas, así como los valores logarítmicos, necesarios para el cálculo de la reproducibilidad, donde:

- **Log R1** = logaritmo en base 10 del número de NMP/100 mL obtenido por recuento en la réplica 1 de una muestra.
- **Log R2** = logaritmo en base 10 del número de NMP/100 mL obtenido por recuento en la réplica 2 de una muestra.
- **Δ Log** = diferencia entre Log R1 y Log R2.
- **(R1- R2)<sup>2</sup> / 2** = media cuadrática de los valores de Log R1 y Log R2.
- **Media** = media aritmética del total de valores obtenidos de (R1- R2)<sup>2</sup> / 2.
- **SR** = reproducibilidad del análisis.

Los resultados obtenidos en NMP/100 mL siguen una distribución asimétrica, de modo que para calcular la reproducibilidad deben normalizarse previamente para poder realizar el análisis estadístico. Para ello se pasan todos los datos a logaritmo en base 10, por lo que la reproducibilidad del análisis también está en logaritmo en base 10.

La reproducibilidad también puede calcularse como desviación estándar relativa (RSDR) de los resultados de Pseudalert<sup>®</sup>, empleando la fórmula:

$$RSD_{Reproducibilidad} = \sqrt{\frac{((RSD A)^2 + (RSD B)^2)}{2}}$$

En este análisis el número de datos es superior al anterior ya que podemos usar aquellos datos de 12 muestras con resultado en Pseudalert<sup>®</sup> pero con resultado negativo o no interpretable en agar cetrimida.

Muestra	Resultado 1 (NMP/mL)	Resultado 2 (NMP/mL)	Log R 1	Log R 2	DifIntra R1 y R2	(DifIntra) <sup>2</sup> / 2	Media	SR
1	155,3	160,7	2,191	2,206	-0,015	0,0001	n =	0,110
2	290,9	387,3	2,464	2,588	-0,124	0,0077		58
3	260,3	228,2	2,415	2,358	0,057	0,0016		
4	178,9	172,3	2,253	2,236	0,016	0,0001		
5	461,1	547,5	2,664	2,738	-0,075	0,0028		
6	579,4	488,4	2,763	2,689	0,074	0,0028		
7	517,2	435,2	2,714	2,639	0,075	0,0028		
8	613,1	686,7	2,788	2,837	-0,049	0,0012		
9	21,6	20,3	1,334	1,307	0,027	0,0004		
10	19,9	35	1,299	1,544	-0,245	0,0301		
11	23,5	23,3	1,371	1,367	0,004	0,0000		
12	48,8	48	1,688	1,681	0,007	0,0000		

13	53,7	71,2	1,730	1,852	-0,123	0,0075
14	65,7	47,1	1,818	1,673	0,145	0,0104
15	11	18,9	1,041	1,276	-0,235	0,0276
16	235,9	167	2,373	2,223	0,150	0,0113
17	980,4	866,4	2,991	2,938	0,054	0,0014
18	1986,3	1553	3,298	3,191	0,107	0,0057
19	290,9	209,8	2,464	2,322	0,142	0,0101
20	307,6	290,9	2,488	2,464	0,024	0,0003
21	14,4	13,7	1,158	1,137	0,022	0,0002
22	816,4	920,8	2,912	2,964	-0,052	0,0014
23	141,4	148,3	2,150	2,171	-0,021	0,0002
24	37,9	38,4	1,579	1,584	-0,006	0,0000
25	547,5	410,6	2,738	2,613	0,125	0,0078
26	290,9	172,5	2,464	2,237	0,227	0,0258
27	5,2	6,3	0,716	0,799	-0,083	0,0035
28	579,4	396,8	2,763	2,599	0,164	0,0135
29	15,8	25,9	1,199	1,413	-0,215	0,0230
30	26,2	32,3	1,418	1,509	-0,091	0,0041
31	11	11,9	1,041	1,076	-0,034	0,0006
32	6,3	6,3	0,799	0,799	0,000	0,0000
33	14,5	20,1	1,161	1,303	-0,142	0,0101
34	33,2	18,7	1,521	1,272	0,249	0,0311
35	47,9	46,5	1,680	1,667	0,013	0,0001
36	6,3	15,8	0,799	1,199	-0,399	0,0797
37	5,2	6,3	0,716	0,799	-0,083	0,0035
38	7,4	9,7	0,869	0,987	-0,118	0,0069
39	4,1	3,1	0,613	0,491	0,121	0,0074
40	5,2	2	0,716	0,301	0,415	0,0861
41	26,6	23,1	1,425	1,364	0,061	0,0019
42	29,2	31,3	1,465	1,496	-0,030	0,0005
43	307,6	290,9	2,488	2,464	0,024	0,0003
44	66,3	93,4	1,822	1,970	-0,149	0,0111
45	261,3	298,7	2,417	2,475	-0,058	0,0017
46	81,6	63,7	1,912	1,804	0,108	0,0058
47	328,2	387,7	2,516	2,588	-0,072	0,0026
48	201,4	240	2,304	2,380	-0,076	0,0029
49	365,4	298,7	2,563	2,475	0,088	0,0038
50	193,5	172,2	2,287	2,236	0,051	0,0013
51	517,2	435,2	2,714	2,639	0,075	0,0028
52	184,2	214,3	2,265	2,331	-0,066	0,0022
53	6,3	5,2	0,799	0,716	0,083	0,0035
54	27,2	33,1	1,435	1,520	-0,085	0,0036
55	37,7	23,5	1,576	1,371	0,205	0,0211

56	365,4	307,6	2,563	2,488	0,075	0,0028
57	46,4	48,1	1,667	1,682	-0,016	0,0001
58	2	8,6	0,301	0,934	-0,633	0,2006

Tabla 14. Precisión obtenida en Pseudalert® para aguas de piscina.

Muestra	Resultado 1 (NMP/g)	Resultado 2 (NMP/g)	Log R 1	Log R 2	DifIntra R1 y R2	(DifIntra) <sup>2</sup> / 2	Media	SR
1	7,344	7,38	0,866	0,868	-0,002	0,0000	0,6027	0,776
2	5,616	8,397	0,749	0,924	-0,175	0,0153	n =	9
3	0,675	0,567	-0,171	-0,246	0,076	0,0029		
4	13,977	0,567	1,145	-0,246	1,392	0,9686		
5	8,154	0,09	0,911	-1,046	1,957	1,9152		
6	2,799	2,709	0,447	0,433	0,014	0,0001		
7	14,418	27,648	1,159	1,442	-0,283	0,0400		
8	14,184	0,09	1,152	-1,046	2,198	2,4146		
9	0,549	1,278	-0,260	0,107	-0,367	0,0673		

Tabla 15. Precisión obtenida en Pseudalert® para arenas de playa.

	Recuperación	Reproducibilidad (S <sub>r</sub> )
<b>Muestras Piscina</b>	101,81%	±0,110 log
<b>Muestras Arena</b>	211,39%	±0,776 log

Tabla 16. Resumen de resultados obtenidos.

## 6.2 Estudio de muestras ambientales

### 6.2.1 Muestras ambientales de agua de piscina

Las muestras ambientales fueron analizadas tal y como se indica en el apartado 4.8, en paralelo mediante Pseudalert® y agar cetrimida, confirmando aquellas que fuera necesario mediante galería bioquímica siguiendo la norma UNE-EN ISO 16266:2008.<sup>21</sup> A partir de 15 muestras de agua de piscina se realizaron 23 análisis, de los cuales 3 se eliminaron por superar el rango del método en el resultado y 2 por resultado negativo. Los resultados obtenidos para cada una de las muestras ambientales se pueden observar en las tablas 17 y 18.

Muestra	Resultado Pseudalert® (NMP/mL)	Referencia Cetrimida (ufc/mL)	Log Vres	Log Vref	Dif INTER (Log VreS - LogVref)	Media (DifInter)	Sd (DifInter)
1	547,5	330	2,738	2,519	0,220		
2	172,5	320	2,237	2,505	-0,268	0,106	0,472
3	5,2	32	0,716	1,505	-0,789	0,106	
4	579,4	390	2,763	2,591	0,172		
5	5,2	2	0,716	0,301	0,415	n =	8
6	26,6	5	1,425	0,699	0,726	% Rec =	127,64506
7	31,3	12	1,496	1,079	0,416		
8	307,6	340	2,488	2,531	-0,043		

Tabla 17. Recuperación obtenida en Pseudalert® para aguas de piscina ambiental.

Muestra	Resultado 1 (NMP/mL)	Resultado 2 (NMP/mL)	Log R 1	Log R 2	DifIntra R1 y R2	(DifIntra) <sup>2</sup> / 2	Media	SR
1	307,6	290,9	2,488	2,464	0,024	0,0003	0,0246	0,157
2	14,4	13,7	1,158	1,137	0,022	0,0002		
3	816,4	920,8	2,912	2,964	-0,052	0,0014	n =	15
4	547,5	410,6	2,738	2,613	0,125	0,0078		
5	290,9	172,5	2,464	2,237	0,227	0,0258		
6	5,2	6,3	0,716	0,799	-0,083	0,0035		
7	579,4	396,8	2,763	2,599	0,164	0,0135		
8	5,2	2	0,716	0,301	0,415	0,0861		
9	26,6	23,1	1,425	1,364	0,061	0,0019		
10	29,2	31,3	1,465	1,496	-0,030	0,0005		
11	27,2	33,1	1,435	1,520	-0,085	0,0036		
12	37,7	23,5	1,576	1,371	0,205	0,0211		
13	365,4	307,6	2,563	2,488	0,075	0,0028		
14	46,4	48,1	1,667	1,682	-0,016	0,0001		
15	2	8,6	0,301	0,934	-0,633	0,2006		

Tabla 18. Precisión obtenida en Pseudalert® para aguas de piscina ambiental.

## 6.2.2 Muestras ambientales de arena de playa

Se realizaron 29 análisis de arenas de playa de los cuales solo 4 se pudieron interpretar, obteniendo un resultado no concluyente, por lo que este resultado fue desechado. Estas muestras de arena de playa no se analizaron por duplicado ya que el objetivo no era calcular la reproducibilidad pues la intención era un screening preliminar ya que desconocíamos cuales podían ser los resultados

puesto que el análisis de muestras de arena de playa mediante Pseudalert® no se había realizado anteriormente en ningún estudio. El análisis de las muestras de arena de playa era uno de los objetivos principales en la realización de este trabajo, pero debido al resultado obtenido se procedió a autoclavar las muestras con el objetivo de trabajar con matrices similares a las muestras ambientales e intentar buscar una explicación a los resultados de las muestras ambientales aunque se trate de una situación no ideal ni cumple con lo requerido por la ENAC, ya que la muestra se convierte en artificial, y las muestras ambientales, que son las que van a ser recibidas por el laboratorio, no son posibles de analizar.

Los resultados de las muestras ambientales de arena de playa con Pseudalert® se descartaron debido a la dificultad en su interpretación. El tono de color y fluorescencia apreciados en los pocillos era muy complejo de determinar como positivo o negativo. En la mayoría de las muestras este tono difícil de clasificar era común a todos los pocillos del blíster, por lo que la toma de decisión por una de las posibilidades cambiaba el resultado de 0 a >2419.6 NMP/100ml y viceversa. Estos resultados fueron consultados con IDEXX, pero debido a que no está indicado para este tipo de muestras no pudo argumentar un razonamiento que diera explicación a la situación observada.

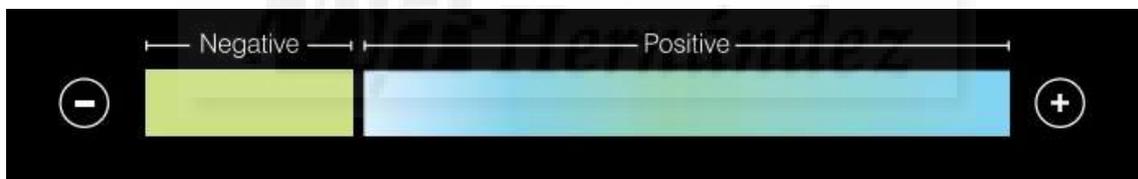


Figura 10. Rango de fluorescencia para la interpretación de los resultados de Pseudalert®.

En algunos casos en los que el método de referencia no presentaba crecimiento, pero el método a validar presentaba pocillos interpretados como positivos, se extrajo el contenido de pocillos al azar y se cultivó en el método de referencia con la intención de descartar falsos positivos, sin embargo, tras 48 horas de cultivo no presentó crecimiento, este problema se ha observado por otros autores con anterioridad.<sup>40</sup>

Es necesario destacar que Pseudalert® está indicado exclusivamente para agua de instalaciones como hospitales, agua embotellada, piscinas y balnearios, no está pensado para el análisis de extracto de arena de playa. El motivo de proponer el uso de Pseudalert® para análisis en extracto de arena de playa fue el precedente del método de detección Colilert®, producto elaborado por IDEXX, y

basado en mecanismos enzimáticos al igual que Pseudalert®, que sí ofrece resultados satisfactorios en este tipo de muestras.

### 6.3 Estudio de interferentes

Para comprobar la selectividad de Pseudalert® en este trabajo fueron utilizados como interferentes *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Enterococcus faecalis*. *E. coli* y *P. fluorescens* se utilizaron para comprobar la presencia o ausencia de fluorescencia en cada lote de Pseudalert® tal como recomienda IDEXX<sup>33</sup>, *E. faecalis* fue utilizado para introducir otro interferente susceptible de generar fluorescencia en adición de los recomendados por IDEXX. Los resultados mostraron ausencia de fluorescencia para los tres interferentes. No se profundizó en la búsqueda de interferentes ya que en la validación realizada por AFNOR fueron utilizados 24 interferentes<sup>16</sup>, no mostrando ninguno de ellos falsos positivos.

*E. coli* también fue usado como interferente en muestras inoculadas con una cantidad conocida de ufc de *P. aeruginosa* y *E. coli* para comprobar si producía alteraciones en la cantidad de ufc detectada por Pseudalert®, obteniendo los siguientes resultados mostrados en la tabla 19, las variaciones que presentan pueden deberse a un error en el procedimiento o a que *P. aeruginosa* crece mejor en un medio líquido que en medio sólido.

MUESTRA	Inóculo	Valor intentado en 100 mL	Pseudalert® R1 NMP/100mL	Pseudalert® R2 NMP/100mL	FM ufc/100mL
1	PA CECT 111 + EC CECT 434 (20/2000)	20	11	18,9	22
2	PA CECT 111 + EC CECT 434 (100/1000)	100	235,9	167	170
3	PA CECT 111 + EC CECT 434 (1000/2500)	1000	980,4	866,4	250
4	PA CECT 111 + EC CECT 434 (2000/20)	2000	1986,3	1553	incontable
5	PA CECT 111 + EC CECT 434 (250/250)	250	290,9	209,8	190
6	PA CECT 111 + EC CECT 434 (2500/1000)	2500	2419,6	2419,6	incontable
7	PA CECT 110 + PF CECT 378	100	141,4	148,3	120

Tabla 19. Resultados de interfrerencia de *E. coli*.

## 7 Discusión

Los laboratorios de diagnóstico microbiológico deben cumplir los requisitos de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005<sup>13</sup>, para demostrar la competencia técnica y la validez de los métodos aplicados. En paralelo, en los Criterios Específicos de Acreditación ENAC-20<sup>14</sup> se especifica la necesidad de realizar la validación a los nuevos métodos microbiológicos o a la modificación de cualquiera de los vigentes, y se establece los parámetros mínimos a estudiar. Dentro de la validación se han estudiado 2 parámetros: recuperación relativa y reproducibilidad.

Los resultados obtenidos en la recuperación de agua de piscina, tanto en el total de las muestras como en las muestras ambientales por separado, presentan una recuperación superior con el método Pseudalert® respecto al método de referencia (cultivo en medio sólido), 102% y 127% respectivamente, mostrándose coherente con resultados en estudios publicados referentes a la comparación de Pseudalert® con métodos de filtración a través de membrana.<sup>22,40,41,42,43,44</sup>

Estos valores de recuperación superiores al 100% indican una mayor capacidad de detectar y recuperar células de *Pseudomonas aeruginosa* con este método rápido. Esta mayor recuperación puede deberse a la gran sensibilidad de Pseudalert® observada en anteriores estudios en los que destacó por su sensibilidad del 100%.<sup>22,45</sup> La explicación a esto es que si en las muestras existen células estresadas (muy habitual en muestras ambientales) o en estado viable no cultivable (VBNC), éstas son más fáciles de recuperar en un cultivo líquido (como es el caso de los pocillos del blíster Quanty Tray 2000 de Pseudalert®) que en cultivo sólido ya que formar una colonia sobre un medio sólido (placa) es una situación más exigente y requiere que la célula esté fisiológicamente activa. Esta situación ya ha sido verificada en el caso de *E. coli*; la recuperación es superior con el método Colilert® análogo al Pseudalert® que con los métodos de aislamiento en medio sólido. Respecto a la diferencia entre los resultados totales y de las muestras ambientales por separado, las cuales presentan una mayor recuperación (102% frente a 127%), una de las explicaciones es el mayor estrés que sufren las células en las muestras ambientales debido a la presencia de otros microorganismos y productos químicos, esta situación puede dificultar su

crecimiento en medio agar mientras que en un medio líquido, como en el caso de Pseudalert<sup>®</sup>, puede encontrarse en un medio más favorable.

Uno de los aspectos observados en este trabajo, y que se ha destacado en estudios, es la capacidad de Pseudalert<sup>®</sup> para recuperar concentraciones muy bajas de células, incluso 1 ufc/100ml, sin interferencias químicas ni biológicas, y de realizar una recuperación correcta aun cuando hay una gran concentración de bacterias capaces de generar interferencias en la interpretación del resultado en el método estándar, debido a que no presenta selectividad exclusiva para *P. aeruginosa*<sup>43,45,46,47</sup>, e incluso puede infraestimar el número de ufc presentes en las muestras<sup>44</sup>. Esta característica permite invertir menos tiempo en la preparación de las muestras ya que no será necesario realizar diluciones en aquellas muestras que presenten una gran cantidad de diferentes microorganismos que dificulten el crecimiento de *P. aeruginosa* y la interpretación del resultado en la placa.

En ciertos estudios se ha observado una especificidad del 100%<sup>48</sup> o cercana (97% y 99%)<sup>40,49</sup> en un conjunto de pocillos positivos del blíster Quanti Tray 2000 comprobados mediante un sistema de filtración a través de membrana. En cambio, en otro estudio se ha observado una especificidad más baja (71%), e incluso falsos positivos para *Pseudomonas fluorescens*, *Morganella morganii*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Myroides spp*<sup>22</sup>. De estos microorganismos que han resultado falsos positivos en trabajos de otros autores, la especie *P. fluorescens* ha sido utilizada como interferente en esta validación realizada y junto a *M. morganii* han sido utilizadas como interferente en la validación realizada por AFNOR, resultando que en ambas validaciones *P. fluorescens* ha presentado un resultado negativo al igual que *M. morganii*.<sup>16</sup>

En el caso de las arenas de playa, los resultados de recuperación observados en las muestras esterilizadas en autoclave y posteriormente contaminadas con cepas muestran una recuperación de 211,39%, notablemente superior al método de referencia. Esto puede deberse ya no tanto a que el Pseudalert<sup>®</sup> está recuperando el doble que el método de referencia sino a que el resultado de crecimiento en placa está subestimado debido a que los restos de sólidos que pueden quedar en el extracto acuoso que se analiza y que pueden dificultar el crecimiento de los microorganismos al depositarse en el filtro de celulosa, haciendo que los valores obtenidos en la lectura del método de referencia sean

acentuadamente inferiores al valor real y sean más fieles en el método Pseudalert®.<sup>22</sup>

Por otro lado, comparando los porcentajes de recuperación obtenidos en las muestras de arena autoclavadas, respecto a las que no lo han sido, se puede observar la posibilidad de que existan microorganismos en las muestras de arena de playa capaces de interferir en el resultado de Pseudalert®, también puede ser debido a características fisicoquímicas de la muestra de arena de playa que se vean alteradas tras ser expuestas a las condiciones generadas en el autoclave. Podría tenerse en cuenta la presencia de células viables pero no cultivables, *P. aeruginosa* es conocida por responder ante condiciones de stress entrando en el estado de célula viable pero no cultivable, en el cual se mantiene activo su metabolismo de forma muy disminuida.<sup>22,41,50</sup>

En cuanto a los resultados de precisión (reproducibilidad), si comparamos el valor de  $S_R$  de las aguas de piscina,  $\pm 0,110$  log, frente al valor de otros métodos microbiológicos aceptados como Colilert®,  $\pm 0,095$  log, observamos una gran similitud, por lo que se puede afirmar que la reproducibilidad en Pseudalert® es comparable a la reproducibilidad de métodos de análisis validados previamente. Sin embargo, los resultados obtenidos de las muestras de arena de playa muestran un valor notablemente mayor,  $\pm 0,770$  log, y más alejado del valor observado tanto en aguas de piscina como en Colilert®, haciendo que los resultados del análisis de muestras de arena de playa sean más variables mediante Pseudalert®, pues la reproducibilidad observada demuestra una gran variación entre los resultados obtenidos por duplicado en Pseudalert®. Este resultado puede deberse a propiedades fisicoquímicas del extracto de arena que disminuyen la capacidad de Pseudalert® de actuar correctamente.

La reproducibilidad observada en las muestras ambientales de agua de piscina,  $\pm 0,157$  log, es ligeramente superior a la observada en el conjunto de muestras inoculadas y las muestras ambientales, esta diferencia puede ser debido que las células de *P. aeruginosa*, aunque capaces de crecer mejor en suspensión que en un medio sólido, se encuentran en un estado de estrés mayor que las células utilizadas para inocular, pues éstas últimas son cepas de laboratorio que se conservan estando en condiciones idóneas para su mantenimiento. Esta situación estresante no permite un crecimiento adecuado, haciendo que sea difícil un crecimiento idéntico en dos extractos de la misma muestra. Aun así, la

reproducibilidad mostrada es aceptable y comparable a la mostrada por Colilert® tomándola como referencia de un método validado.

Existen otros factores que pueden generar variabilidad en los resultados de Pseudalert®, uno de ellos es la ausencia de una intensidad de fluorescencia objetiva para determinar si la muestra es positiva o negativa. En la documentación suministrada por el fabricante viene detallado el rango de tonos de fluorescencia que se deben considerar positivos, siendo siempre necesaria la comparación con un blanco, que se debe preparar junto a cada tanda de muestras realizadas ya que el color del blanco puede variar una vez superado el tiempo recomendado de incubación. Al tratarse de un valor subjetivo pueden darse diferentes resultados según el analista que interprete, en especial aquellos tonos de fluorescencia cercanos a parámetros negativos, haciendo que en aquellos casos en los que toda fluorescencia presentada por un blíster se encuentre en este rango dudoso exista la posibilidad de dar como resultado falsos positivos o negativos. Cuanto mayor sea el número de muestras la interpretación de los resultados será mejor ya que se observarán más intensidades de fluorescencia diferentes en un corto período de tiempo haciendo posible apreciar diferencias más sutiles en la intensidad de la fluorescencia y hará más sencillo el criterio de clasificación entre positivo y negativo. Esta dificultad puede ser la responsable de aquellos resultados de especificidad de Pseudalert® más alejados del 100%, además se considera que con el paso del tiempo y el aumento de la experiencia del analista la especificidad de los resultados se verá aumentada<sup>49</sup>. Esto no ocurre con el Colilert®, en cuyo caso la interpretación de la fluorescencia en los pocillos del blíster es más sencilla y objetiva.

Otro de los puntos débiles del método Pseudalert® es la necesidad de una estufa exclusiva para la incubación, ya que el rango de temperatura requerido ( $38\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) no es frecuente en las estufas del laboratorio, pues se utilizan temperaturas que abarcan el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos y la temperatura necesaria para Pseudalert® no coincide con los rangos de temperatura con los que se trabajan en los laboratorios de microbiología. Otro punto a tener en cuenta es la recomendación de realizar un método de confirmación tras el análisis con Pseudalert®<sup>22</sup>, siendo esta recomendación anecdótica, ya que solo es propuesta por un único estudio de los observados (en

el que se observó una baja especificidad que el propio artículo defiende que posiblemente mejoraría al aumentar la experiencia del analista para interpretar los resultados.

A nivel práctico, desde el punto de vista de los laboratorios de diagnóstico medioambiental, los materiales del método Pseudalert® son más caros que los materiales de los métodos de referencia. Sin embargo, este coste se ve compensado por las reducciones de tiempo de trabajo del analista y la ausencia de realizar una prueba de confirmación<sup>40</sup>.

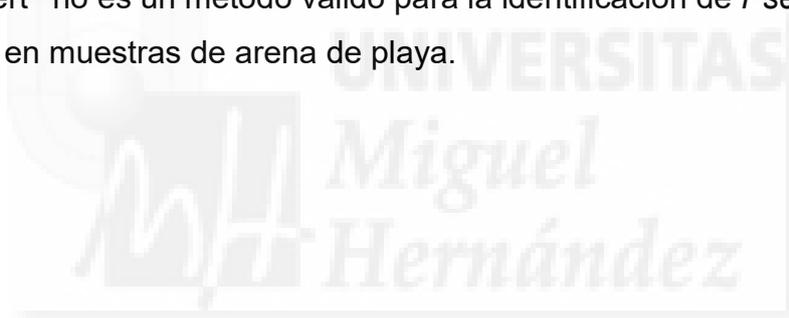
Como punto a destacar de Pseudalert® es que al reducir el tiempo de análisis a 24h va a favorecer notablemente la reducción de trabajo, de especial importancia en los laboratorios que se analizan grandes cantidades de muestras de agua de piscinas, pues se requiere mucha rapidez para poder suministrar al cliente la información por la importancia del control sanitario de las aguas de piscina, evitando posibles exposiciones a *P. aeruginosa* y poder aplicar las medidas correctoras oportunas para que no exista un riesgo para la salud de los bañistas, además de poder reducir la carga de trabajo de las muestras de piscina a analizar en el laboratorio.

Aunque la legislación suele referirse a la norma ISO en estos análisis, además de la obligatoriedad de usar el método ISO para análisis oficiales de cumplimiento de legislación, la posibilidad de expresar el resultado en NMP está reflejada en el Real Decreto 742/2013, por lo que nos facilita el uso del método Pseudalert®, pues se trata del único medio comercializado para la detección de *P. aeruginosa* que expresa su resultado en NMP.

## 8 Conclusiones

De este trabajo pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. La recuperación de *Pseudomonas aeruginosa* del método Pseudalert® es superior a la obtenida por el método ISO en agar cetrimida.
2. Pseudalert® ofrece mejores resultados en muestras con un alto nivel de sólidos en suspensión, ya que estos no interfieren en la detección.
3. Pseudalert® es apropiado para recuperar células de *Pseudomonas* viables pero no cultivables en placa, lo que implica una mayor capacidad de detectar el riesgo sanitario asociado a la presencia de este microorganismo en el agua.
4. Las muestras de agua muestran una precisión comparable a métodos aceptados demostrando ser aceptable.
5. El uso de Pseudalert® supone un notable ahorro de tiempo para el laboratorio analista.
6. Pseudalert® no es un método válido para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras de arena de playa.



## 9 Bibliografía

- 
- <sup>1</sup> Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Médica. 8ª ed. Barcelona: Elsevier; 2017
- <sup>2</sup> Madigan M. T, Martinko J.M, Dunlap P. V., Clark, D. P. Brock, Biología de los microorganismos. 12ª ed. Madrid: Pearson; 2009
- <sup>3</sup> Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas*. En: Jorgensen J. H., Pfaller, M. A., Carroll K.C., Funke G., Landry M. L., Richter S.S., et al. editores. Manual of Clinical Microbiology. 11ª ed. Washington: ASM Press; 2015. p. 773-90
- <sup>4</sup> Willey J., Sherwood L., Woolverton C. J. Prescott's principles of microbiology. Ed. Internacional. Boston; Madrid: McGraw-Hill Higher Education; 2009
- <sup>5</sup> Ryan K. J., Ray C.G., Ahmad N., Drew W.L., Lagunoff M., Pottinger P., et al. Sherris. Microbiología médica. 6ª ed. México: McGraw-Hill; 2017
- <sup>6</sup> SEIMC Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 1ª ed. Ausina Ruiz V., Santiago Moreno Guillén S., editores. Madrid: Médica Panamericana; 2005
- <sup>7</sup> Instituto Nacional Salud y Seguridad en el Trabajo. DATABIO. [Internet]. [Consultado 20 Nov 2018]. Disponible en: <http://www.insht.es>
- <sup>8</sup> WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Internet]. 2017 [Consultado 20 nov. 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
- <sup>9</sup> WHO. Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities [Internet]. 2017 [Consultado 20 nov. 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/infection-prevention/publications/guidelines-cre/en/>
- <sup>10</sup> World Health Organization. Water, Sanitation and Health Team. Guidelines for safe recreational water environments. Volume 2, Swimming pools and similar environments [Internet]. Ginebra: World Health Organization; 2006 [consultado dic. 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/43336>.
- <sup>11</sup> Rice SA, van den Akker B, Pomati F, Roser D. A risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools: a review. J Water Health. 2012 June; 10(2): 181-96.
- <sup>12</sup> Mohammed RL, Echeverry A, Stinson CM, Green M, Bonilla TD, Hartz A, et al. Survival trends of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Clostridium perfringens* in a sandy South Florida beach. Mar Pollut Bull. 2012 June; 64(6): 1201-9.
- <sup>13</sup> UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- <sup>14</sup> CEA-ENAC – 20 Rev. 1 Criterios Específicos de Acreditación. Análisis microbiológico (mayo 2017)
- <sup>15</sup> Camaró-Sala M L, Martínez-García R, Olmos-Martínez P, Catalá-Cuenca V, Ocete-Mochón M D, Gimeno-Cardona C. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015; 33 (2): e31-6.
- <sup>16</sup> AFNOR. PSEUDALERT / QUANTI-TRAY For the enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* Protocol for human consumption waters and pool Waters [Internet]. V2. AFNOR; 2016[acceso 16 de agosto de 2019]. Disponible en: [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2016/08/Synt-IDX-33-05-03-16\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2016/08/Synt-IDX-33-05-03-16_en.pdf)
- <sup>17</sup> Real Decreto 742/2013, de 27 de septiembre, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de las piscinas. Boletín Oficial del Estado, núm. 244, (11 de octubre de 2013).

- 
- <sup>18</sup> Orden de 31 de mayo de 1960 sobre piscinas públicas. Boletín Oficial del Estado, núm. 141, (13 de junio de 1960).
- <sup>19</sup> Orden de 12 de julio de 1961 por la que se someten las piscinas privadas a lo dispuesto en la de 31 de mayo de 1960, reguladora del funcionamiento de estas instalaciones de carácter público. Boletín Oficial del Estado, núm. 183, (2 de agosto de 1961).
- <sup>20</sup> DECRETO 255/1994, de 7 de diciembre, del Gobierno Valenciano, por el que se regulan las normas higiénico-sanitarias y de seguridad de las piscinas de uso colectivo y de los parques acuáticos. Diari Oficial de la Generalitat Valenciana, núm. 2414, (27 de diciembre de 1994).
- <sup>21</sup> UNE-EN ISO 16266:2008 "Calidad del agua. Detección y recuento de *Pseudomonas aeruginosa*. Método por filtración en membrana."
- <sup>22</sup> Ngwa GA, Schop R, Chow J, Lukic L, McKague K. Comparative detection and recovery of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration and a Most Probable Number technique. J Microbiol Methods. 2017 feb; 133:76-81
- <sup>23</sup> IDEXX. Pseudalert [Internet] [Acceso 13 marzo 2019] Disponible en: <https://www.idexx.es/es/water/water-products-services/pseudalert/>
- <sup>24</sup> UNE-EN ISO9001:2015 "Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos".
- <sup>25</sup> UNE-EN ISO 17034:2017 "Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia".
- <sup>26</sup> Procedimiento de ensayo interno "A-E-PE-0050 Sistemas BBL CRYSTAL de Identificación Bioquímica"
- <sup>27</sup> Procedimiento de ensayo interno "A-E-PE-0036 Preparación de muestras sólidas para su análisis microbiológico":
- <sup>28</sup> Procedimiento de ensayo interno "A-E-PE-0007 Determinación de *Pseudomonas aeruginosa*"
- <sup>29</sup> Procedimiento de ensayo interno "A-E-PE-0022 Preparación y control de calidad de medios de cultivo"
- <sup>30</sup> Procedimiento de ensayo interno "A-E-PE-0061 Recuento de coliformes totales y *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidasa + por filtración en membrana"
- <sup>31</sup> Procedimiento de ensayo interno "A-E-PE-0013 Detección y recuento de estreptococos fecales y enterococos por filtración en membrana".
- <sup>32</sup> Procedimiento de ensayo interno "A-E-PE-0031 Preparación de muestras para análisis microbiológicos"
- <sup>33</sup> IDEXX [Internet]. Maine: IDEXX; [acceso 23 de marzo de 2019].Pseudalert test procedure. Disponible en: <https://www.idexx.es/files/pseudalert-procedure-rev-en.pdf>.
- <sup>34</sup> UNE-EN ISO 6887-1:2017 Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.
- <sup>35</sup> Procedimiento de ensayo interno "A-E-PE- 0012 Procedimiento de ensayo para la realización de PCR de confirmación."
- <sup>36</sup> Xu J, Moore JE, Murphy PG, Millar BC, Elborn JS. Early detection of *Pseudomonas aeruginosa*--comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2004 Oct 20;3:21.
- <sup>37</sup> Procedimiento de ensayo interno "A-E-PE- 0009 Electroforesis analítica de DNA en gel de agarosa"
- <sup>38</sup> UNE-EN ISO 13843:2018. Calidad del agua. Requisitos para el establecimiento de las características de funcionamiento de los métodos microbiológicos cuantitativos.

---

<sup>39</sup> ISO/TS 19036:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.

<sup>40</sup>Sartory DP, Brewer M, Beswick A, Steggle D. Evaluation of the Pseudalert/Quanti-Tray MPN Test for the Rapid Enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in Swimming Pool and Spa Pool Waters. *Curr Microbiol*. 2015 Dec;71(6):699-705.

<sup>41</sup>Bédard E, Charron D, Lalancette C, Déziel E, Prévost M. Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper- and chlorine-induced stress. *FEMS Microbiol Lett*. 2014 Jul;356(2):226-34.

<sup>42</sup>IDEXX Laboratories inc. Pseudalert Technical Bulletin. Comparative evaluation between Pseudalert/Quanti Tray and ISO 16266 PACN membrane filtration method for the enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming spa pool water samples.UK. 2015

<sup>43</sup> IDEXX Laboratories Inc., 2011. Comparison of the performance of the IDEXX Pseudalert test against the EN ISO 16266:2008 Method at recovering confirmed *Pseudomonas aeruginosa* from pool/spa water samples (IDEXX Summary 14B, Rev 11032010). UK. 2010.

<sup>44</sup> IDEXX Laboratories Inc., 2010. Comparison of the performance of the IDEXX Pseudalert test against the Millipore™ and Cetrimide membrane filtration methods at recovering confirmed *Pseudomonas aeruginosa* from bottled water samples (IDEXX Summary 14C, Rev 12202010). UK. 2010.

<sup>45</sup> IDEXX Laboratories Inc., 2011. Comparing the performance of the IDEXX Pseudalert test against the a modified versión of the ISO 16266:2006 method used at a major bottled wáter company for the recovey and specific detection of confirmed *Pseudomonas aeruginosa* from water samples (IDEXX Summary 14G, Rev 09222011-1). UK. 2011.

<sup>46</sup> IDEXX Laboratories Inc., 2010. Comparison of the performance of the IDEXX Pseudalert test against SM 9213E at recovering confirmed *Pseudomonas aeruginosa* from pool/spa water samples (IDEXX Summary 14A, Rev 11032010). UK. 2010.

<sup>47</sup> IDEXX Laboratories Inc., 2010. Comparison of the performance of the IDEXX Pseudalert test against the ISO 16266 at recovering confirmed *Pseudomonas aeruginosa* from thermal pool and bottled water samples (IDEXX Summary 14D, Rev 03252011). UK. 2010.

<sup>48</sup> Hall, N., Lord, C., Kempf, J., Lueck, C., Rieflin, C., Owens, K., "Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in Private Spa Water" (IDEXX Summary 14E). En: Iowa meeting of State Public Health Labs and Officials. Iowa. State Hygienic Laboratory, University of Iowa Research Park, Iowa City, IA 52242. 2011.

<sup>49</sup> IDEXX Laboratories Inc., 2011 "Bestimmung von pseudomonas aeruginosa im schwimm- und badebeckenwasser mit dem pseudalert-verfahren besondere eignung zur untersuchung von naturfreibädern?" (IDEXX Summary 14F, Rev 07182011-3). UK. 2011.

<sup>50</sup> Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2010 Jul;34(4):415-25

## ANEXO I. Ficha de análisis de pastilla suministrada por IELAB.



# ANALYSIS REPORT



## BAControl -5

(reference material, RM)

**Producer**  
ielab Calidad, S.L.  
C/ Dracma, 16  
Pol. Ind. Las Atalayas  
03114 Alicante (Spain)  
T+34 966 10 55 01 - F+34 966 10 55 03

**Producer analysis conditions**  
**Laboratory:** one laboratory following ISO 17025 requirements  
**Dilutions:** Up to 10<sup>1</sup>  
**Analyzed volume:** 3 mL  
**Technique:** Filtration  
**Incubation temperature:** 37 ± 1°C  
**Incubation period:** 48 ± 2 hours  
**Culture medium:** Pseudomonas CN agar  
**Filtration membranes:** Mixed cellulose esters

**Description**  
**Part N.:** 990107  
**Microorganism:** *Pseudomonas aeruginosa* V11 traceable to ATCC 27853 (WDCM 00025), with one subcultures from the received lyophilized strain.  
**Batch N.:** PPA07116  
**Manufacturing date:** 07/Nov/2016  
**Expiry date:** 30/Nov/2017

**Quality controls in the described analysis conditions**  
**Contamination:** Not detected  
**Homogeneity:** Homogeneous (ISO Guide 35)  
**Stability:** Stable (ISO Guide 35)

**Authenticity proof**  
Biochemical identification tests or molecular methods

**Results**  
**Percentage of the analyzed batch:** 15%  
**Number of tests:** 50  
**Obtained value per tablet:** 2.46x10<sup>3</sup> cfu  
**95% Confidence interval:** 1.51x10<sup>3</sup> - 3.99x10<sup>3</sup> cfu

**Safety information**  
Risk group 2

**Storage conditions**  
Keep at -20 ± 5°C

**Intended use**  
Routine quality controls (control of process, control charts and culture media quality controls).

**Reconstitution conditions**  
(indicated in the User Guide)  
**Solvent:** Sterile water  
**Volume:** 20 mL  
**Reconstitution time:** 10 minutes

Alicante, November 30<sup>th</sup> 2016.

  
Vicente Catalán Cuenca  
Product Manager

**ielab**  
comercial@ielab.es  
www.ielab.es

ANEXO II. Tabla suministrada por IDEXX para la interpretación de los blíster Quanti-Tray®/2000

# Large Wells Positive	IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 100ml)																								
	# Small Wells Positive																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.1	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.3	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.1	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.4	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.7	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.5	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.3	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	16.0	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.5	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.6	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.4	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.8	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.5	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.2	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.5	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.1	25.3	26.6	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.5	47.8	49.2	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.5	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.9	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.8	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.8	62.3
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.5	36.8	38.3	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.7	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	52.0	53.5	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.6	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.4	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	42.0	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.3	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.2	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.7	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.4
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.9	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.2	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.8	56.5	58.3	60.2	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.6	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	67.0	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.2	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	70.0	72.2	74.4	76.7	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.4	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.6	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.0
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.8	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.3	127.4	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.4	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.4	126.7	130.1	133.6	137.2	140.8	144.5	148.3	152.2	156.1	160.2
43	87.6	90.4	93.2	96.0	99.0	101.9	105.0	108.1	111.2	114.5	117.8	121.1	124.6	128.1	131.7	135.4	139.1	143.0	147.0	151.0	155.2	159.4	163.8	168.2	172.8
44	93.1	96.1	99.1	102.2	105.4	108.6	111.9	115.3	118.7	122.3	125.9	129.6	133.4	137.4	141.4	145.5	149.7	154.1	158.5	163.1	167.9	172.7	177.7	182.9	188.2
45	99.3	102.5	105.8	109.2	112.6	116.2	119.8	123.6	127.4	131.4	135.4	139.6	143.9	148.3	152.9	157.6	162.4	167.4	172.6	178.0	183.5	189.2	195.1	201.2	207.5
46	106.3	109.8	113.4	117.2	121.0	125.0	129.1	133.3	137.6	142.1	146.7	151.5	156.5	161.6	167.0	172.5	178.2	184.2	190.4	196.8	203.5	210.5	217.8	225.4	233.3
47	114.3	118.3	122.4	126.6	130.9	135.4	140.1	145.0	150.0	155.3	160.7	166.4	172.3	178.5	185.0	191.8	198.9	206.4	214.2	222.4	231.0	240.0	249.5	259.5	270.0
48	123.9	128.4	133.1	137.9	143.0	148.3	153.9	159.7	165.8	172.2	178.9	186.0	193.5	201.4	209.8	218.7	228.2	238.2	248.9	260.3	272.3	285.1	298.7	313.0	328.2
49	135.5	140.8	146.4	152.3	158.5	165.0	172.0	179.3	187.2	195.6	204.6	214.3	224.7	235.9	248.1	261.3	275.5	290.9	307.6	325.5	344.8	365.4	387.3	410	

## IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 100ml)

# Large Wells Positive	# Small Wells Positive																									
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48		
0	25.3	26.4	27.4	28.4	29.5	30.5	31.5	32.6	33.6	34.7	35.7	36.8	37.8	38.9	40.0	41.0	42.1	43.1	44.2	45.3	46.3	47.4	48.5	49.5		
1	26.6	27.7	28.7	29.8	30.8	31.9	32.9	34.0	35.0	36.1	37.2	38.2	39.3	40.4	41.4	42.5	43.6	44.7	45.7	46.8	47.9	49.0	50.1	51.2		
2	27.9	29.0	30.0	31.1	32.2	33.2	34.3	35.4	36.5	37.5	38.6	39.7	40.8	41.9	43.0	44.0	45.1	46.2	47.3	48.4	49.5	50.6	51.7	52.8		
3	29.3	30.4	31.4	32.5	33.6	34.7	35.8	36.8	37.9	39.0	40.1	41.2	42.3	43.4	44.5	45.6	46.7	47.8	48.9	50.0	51.2	52.3	53.4	54.5		
4	30.7	31.8	32.8	33.9	35.0	36.1	37.2	38.3	39.4	40.5	41.6	42.8	43.9	45.0	46.1	47.2	48.3	49.5	50.6	51.7	52.9	54.0	55.1	56.3		
5	32.1	33.2	34.3	35.4	36.5	37.6	38.7	39.9	41.0	42.1	43.2	44.4	45.5	46.6	47.7	48.9	50.0	51.2	52.3	53.5	54.6	55.8	56.9	58.1		
6	33.5	34.7	35.8	36.9	38.0	39.2	40.3	41.4	42.6	43.7	44.8	46.0	47.1	48.3	49.4	50.6	51.7	52.9	54.1	55.2	56.4	57.6	58.7	59.9		
7	35.0	36.2	37.3	38.4	39.6	40.7	41.9	43.0	44.2	45.3	46.5	47.7	48.8	50.0	51.2	52.3	53.5	54.7	55.9	57.1	58.3	59.4	60.6	61.8		
8	36.6	37.7	38.9	40.0	41.2	42.3	43.5	44.7	45.9	47.0	48.2	49.4	50.6	51.8	53.0	54.1	55.3	56.5	57.7	59.0	60.2	61.4	62.6	63.8		
9	38.1	39.3	40.5	41.6	42.8	44.0	45.2	46.4	47.6	48.8	50.0	51.2	52.4	53.6	54.8	56.0	57.2	58.4	59.7	60.9	62.1	63.4	64.6	65.8		
10	39.7	40.9	42.1	43.3	44.5	45.7	46.9	48.1	49.3	50.6	51.8	53.0	54.2	55.5	56.7	57.9	59.2	60.4	61.7	62.9	64.2	65.4	66.7	67.9		
11	41.4	42.6	43.8	45.0	46.3	47.5	48.7	49.9	51.2	52.4	53.7	54.9	56.1	57.4	58.6	59.9	61.2	62.4	63.7	65.0	66.3	67.5	68.8	70.1		
12	43.1	44.3	45.6	46.8	48.1	49.3	50.6	51.8	53.1	54.3	55.6	56.8	58.1	59.4	60.7	62.0	63.2	64.5	65.8	67.1	68.4	69.7	71.0	72.4		
13	44.9	46.1	47.4	48.6	49.9	51.2	52.5	53.7	55.0	56.3	57.6	58.9	60.2	61.5	62.8	64.1	65.4	66.7	68.0	69.3	70.7	72.0	73.3	74.7		
14	46.7	48.0	49.3	50.5	51.8	53.1	54.4	55.7	57.0	58.3	59.6	60.9	62.3	63.6	64.9	66.3	67.6	68.9	70.3	71.6	73.0	74.4	75.7	77.1		
15	48.6	49.9	51.2	52.5	53.8	55.1	56.4	57.8	59.1	60.4	61.8	63.1	64.5	65.8	67.2	68.5	69.9	71.3	72.6	74.0	75.4	76.8	78.2	79.6		
16	50.5	51.8	53.2	54.5	55.8	57.2	58.5	59.9	61.2	62.6	64.0	65.3	66.7	68.1	69.5	70.9	72.3	73.7	75.1	76.5	77.9	79.3	80.8	82.2		
17	52.5	53.9	55.2	56.6	58.0	59.3	60.7	62.1	63.5	64.9	66.3	67.7	69.1	70.5	71.9	73.3	74.8	76.2	77.6	79.1	80.5	82.0	83.5	84.9		
18	54.6	56.0	57.4	58.8	60.2	61.6	63.0	64.4	65.8	67.2	68.6	70.1	71.5	73.0	74.4	75.9	77.3	78.8	80.3	81.8	83.3	84.8	86.3	87.8		
19	56.8	58.2	59.6	61.0	62.4	63.9	65.3	66.8	68.2	69.7	71.1	72.6	74.1	75.5	77.0	78.5	80.0	81.5	83.1	84.6	86.1	87.6	89.2	90.7		
20	59.0	60.4	61.9	63.3	64.8	66.3	67.7	69.2	70.7	72.2	73.7	75.2	76.7	78.2	79.8	81.3	82.8	84.4	85.9	87.5	89.1	90.7	92.2	93.8		
21	61.3	62.8	64.3	65.8	67.3	68.8	70.3	71.8	73.3	74.9	76.4	77.9	79.5	81.1	82.6	84.2	85.8	87.4	89.0	90.6	92.2	93.8	95.4	97.1		
22	63.8	65.3	66.8	68.3	69.8	71.4	72.9	74.5	76.1	77.6	79.2	80.8	82.4	84.0	85.6	87.2	88.9	90.5	92.1	93.8	95.5	97.1	98.8	100.5		
23	66.3	67.8	69.4	71.0	72.5	74.1	75.7	77.3	78.9	80.5	82.2	83.8	85.4	87.1	88.7	90.4	92.1	93.8	95.5	97.2	98.9	100.6	102.4	104.1		
24	68.9	70.5	72.1	73.7	75.3	77.0	78.6	80.3	81.9	83.6	85.2	86.9	88.6	90.3	92.0	93.8	95.5	97.2	99.0	100.7	102.5	104.3	106.1	107.9		
25	71.7	73.3	75.0	76.6	78.3	80.0	81.7	83.3	85.1	86.8	88.5	90.2	92.0	93.7	95.5	97.3	99.1	100.9	102.7	104.5	106.3	108.2	110.0	111.9		
26	74.6	76.3	78.0	79.7	81.4	83.1	84.8	86.6	88.4	90.1	91.9	93.7	95.5	97.4	99.3	101.2	103.1	105.0	106.9	108.8	110.8	112.7	114.7	116.2		
27	77.6	79.4	81.1	82.9	84.6	86.4	88.2	90.0	91.9	93.7	95.5	97.4	99.3	101.2	103.1	105.0	106.9	108.8	110.8	112.7	114.7	116.7	118.7	120.7		
28	80.6	82.6	84.4	86.3	88.1	89.9	91.8	93.7	95.6	97.5	99.4	101.3	103.3	105.2	107.2	109.2	111.2	113.2	115.2	117.3	119.3	121.4	123.5	125.6		
29	84.2	86.1	87.9	89.8	91.7	93.7	95.6	97.5	99.5	101.5	103.5	105.5	107.5	109.5	111.6	113.7	115.7	117.8	120.0	122.1	124.2	126.4	128.6	130.8		
30	87.8	89.7	91.7	93.6	95.6	97.6	99.6	101.6	103.7	105.7	107.8	109.9	112.0	114.2	116.3	118.5	120.6	122.8	125.1	127.3	129.5	131.8	134.1	136.4		
31	91.6	93.6	95.6	97.7	99.7	101.8	103.9	106.0	108.2	110.3	112.5	114.7	116.9	119.1	121.4	123.6	125.9	128.2	130.5	132.9	135.3	137.7	140.1	142.5		
32	95.7	97.8	99.9	102.0	104.2	106.3	108.5	110.7	113.0	115.2	117.5	119.8	122.1	124.5	126.8	129.2	131.6	134.0	136.5	139.0	141.5	144.0	146.6	149.1		
33	100.0	102.2	104.4	106.6	108.9	111.2	113.5	115.8	118.2	120.5	122.9	125.4	127.8	130.3	132.8	135.3	137.8	140.4	143.0	145.6	148.3	150.9	153.7	156.4		
34	104.7	107.0	109.3	111.7	114.0	116.4	118.9	121.3	123.8	126.3	128.8	131.4	134.0	136.6	139.2	141.9	144.6	147.4	150.1	152.9	155.7	158.6	161.5	164.4		
35	109.7	112.2	114.6	117.1	119.6	122.2	124.7	127.3	129.9	132.6	135.3	138.0	140.8	143.6	146.4	149.2	152.1	155.0	158.0	161.0	164.0	167.1	170.2	173.3		
36	115.2	117.8	120.4	123.0	125.7	128.4	131.1	133.9	136.7	139.5	142.4	145.3	148.3	151.3	154.3	157.3	160.5	163.6	166.8	170.0	173.3	176.6	179.9	183.3		
37	121.3	124.0	126.8	129.6	132.4	135.3	138.2	141.2	144.2	147.3	150.3	153.5	156.7	159.9	163.1	166.5	169.8	173.2	176.7	180.2	183.7	187.3	191.0	194.7		
38	127.9	130.8	133.8	136.8	139.9	143.0	146.2	149.4	152.6	155.9	159.2	162.6	166.1	169.6	173.2	176.8	180.4	184.2	188.0	191.8	195.7	199.7	203.7	207.7		
39	135.3	138.5	141.7	145.0	148.3	151.7	155.1	158.6	162.1	165.7	169.4	173.1	176.9	180.7	184.7	188.7	192.7	196.8	201.0	205.3	209.6	214.0	218.5	223.0		
40	143.7	147.1	150.6	154.2	157.8	161.5	165.3	169.1	173.0	177.0	181.1	185.2	189.4	193.7	198.1	202.5	207.1	211.7	216.4	221.1	226.0	231.0	236.0	241.1		
41	153.2	157.0	160.9	164.8	168.9	173.0	177.2	181.5	185.8	190.3	194.8	199.5	204.2	209.1	214.0	219.1	224.2	229.4	234.8	240.2	245.8	251.5	257.2	263.1		
42	164.3	168.6	172.9	177.3	181.9	186.5	191.3	196.1	201.1	206.2	211.4	216.7	222.2	227.7	233.4	239.2	245.2	251.3	257.5	263.8	270.3	276.9	283.6	290.5		
43	177.5	182.3	187.3	192.4	197.6	202.9	208.4	214.0	219.8	225.8	231.8	238.1	244.5	251.0	257.7	264.6	271.7	278.9	286.3	293.8	301.5	309.4	317.4	325.7		
44	193.6	199.3	205.1	211.0	217.2	223.5	230.0	236.7	243.6	250.8	258.1	265.6	273.3	281.2	289.4	297.8	306.3	315.1	324.1	333.3	342.8	352.4	362.3	372.4		
45	214.1	220.9	227.9	235.2	242.7	250.4	258.4	266.7	275.3	284.1	293.3	302.6	312.3	322.3	332.5	343.0	353.8	364.9	376.2	387.9	399.8	412.0	424.5	437.4		
46	241.5	250.0	258.9	268.2	277.8	287.8	298.1	308.8	319.9	331.4	343.3	355.5	368.1	381.1	394.5	408.3	422.5	437.1	452.0	467.4	483.3	499.6	516.3	533.5		
47	280.9	292.4	304.4	316.9	330.0	343.6	357.8	372.5	387.7	403.4	419.8	436.6	454.1	472.1	490.7	509.9	529.8	550.4	571.7	593.8	616.7	640.5	665.3	691.0		
48	344.1	360.9	378.4	396.8	416.0	436.0	456.9	478.6	501.2	524.7	549.3	574.8	601.5	629.4	658.6	689.3	721.5	755.6	791.5	829.7	870.4	913.9	960.6	1011.2		
49	461.1	488.4	517.2	547.5	579.4	613.1	648.8	686.7	727.0	770.1	816.4	866.4	920.8	980.4	1046.2	1119.9	1203.3	1299.7	1413.6	1553.1	1732.9	1966.3	2419.6	>2419.6		

ANEXO III. Datos primarios de análisis de agua de piscina.

DATOS PRIMARIOS												
MUESTRA	Fecha	ID	Origen	Inóculo	Valor intentado en 100 mL	PSEUDALERT R1			PSEUDALERT R2			FM
						Pocillos grandes	Pocillos pequeños	NMP/100mL	Pocillos grandes	Pocillos pequeños	NMP/100mL	ufc/100mL
1	03-may-17	3591175	Murcia	PA CECT 108	30	47	9	155,3	47	10	160,7	190
2	03-may-17	3682897	Extremadura	PA CECT 108	30	49	17	290,9	49	22	387,3	300
3	03-may-17	3784335	Extremadura	PA CECT 108	30	47	13	178,5	28	0	39,5	100
4	03-may-17	3591178	Murcia	PA CECT 108	30	48	19	260,3	48	16	228,2	150
5	03-may-17	3591158	Murcia	PA CECT 108	30	48	10	178,9	47	12	172,3	0
6	03-may-17	3591768	Murcia	PA CECT 108	80	49	30	613,4	49	49	325,5	310
7	03-may-17	3591770	Murcia	PA CECT 108	80	49	25	461,1	47	28	547,5	0
8	03-may-17	-	Alicante	PA CECT 108	80	49	29	579,4	37	26	488,4	300
9	03-may-17	-	Alicante	PA CECT 108	80	49	27	517,2	33	24	435,2	340
10	03-may-17	-	Alicante	PA CECT 108	80	49	30	613,1	37	32	686,7	310
11	10-may-17	-	San Juan de Alicante	PA CECT 111	30	17	1	21,6	17	0	20,3	22
12	10-may-17	-	San Juan de Alicante	PA CECT 111	30	15	2	19,9	25	1	35	25
13	10-may-17	-	San Juan de Alicante	PA CECT 111	30	15	5	23,5	19	0	23,3	18
14	10-may-17	-	San Juan de Alicante	PA CECT 111	80	28	6	48,8	29	4	48	51
15	10-may-17	-	San Juan de Alicante	PA CECT 111	80	30	6	53,7	37	4	71,2	60
16	10-may-17	-	San Juan de Alicante	PA CECT 111	80	33	8	65,7	30	2	47,1	67
17	11-may-17	-	Alicante	PA CECT 111 + EC CECT 434 (20/2000)	20	10	1	11	16	1	18,9	22
18	11-may-17	-	Alicante	PA CECT 111 + EC CECT 434 (100/1000)	100	49	13	235,9	46	14	167	170

19	11-may-17	-	Alicante	PA CECT 111 + EC CECT 434 (1000/2500)	1000	49	38	980,4	49	36	866,4	250
20	11-may-17	-	Alicante	PA CECT 111 + EC CECT 434 (2000/20)	2000	49	46	1986,3	49	44	1553	incontable
21	11-may-17	-	Alicante	PA CECT 111 + EC CECT 434 (250/250)	250	49	17	290,9	48	14	209,8	190
22	11-may-17	-	Alicante	PA CECT 111 + EC CECT 434 (2500/1000)	2500	49	47	2419,6	49	47	2419,6	incontable
23	17-may-17	3172982	Tarragona	P.A. +	1800	49	48	>2419,6	49	48	>2419,6	flora propia
24	17-may-17	3172983	Tarragona	P.A. +	49	49	18	307,6	49	17	290,9	incontable
25	17-may-17	3747660	O barco	P.A. +	200000	49	48	>2419,6	49	48	2419,6	flora propia
26	17-may-17	3777293	Tarragona	P.A. +	200	10	3	14,4	5	8	13,7	incontable
27	17-may-17	3826761	Tarragona	P.A. +	8	49	48	>2419,6	49	48	>2419,6	incontable
28	17-may-17	3747660	O barco	P.A. +	2000	49	35	816,4	49	37	920,8	incontable
29	17-may-17	-	Elda	PF CECT 378	0	0	0	0				0
30	17-may-17	-	Elda	EF CECT 481	0	0	0	0				0
31	17-may-17	-	Elda	PA CECT 110	100	44	14	141,4	45	13	148,3	120
32	17-may-17	-	Elda	PA CECT 110	1500	49	48	>2419,6	49	46	>2419,6	incontable
33	17-may-17	-	Elda	PA CECT 110	25	25	3	37,9	26	2	38,4	35
34	18-may-17	-	Elda	PA CECT 110	125	49	48	>2419,6	49	48	>2419,6	incontable
35	25-may-17	3178325	Tarragona	P.A. +	18	49	28	547,5	49	23	410,6	330
36	25-may-17	3747660	O barco	P.A. +	20	0	0	0	0	0	0	45
37	25-may-17	3747660	O barco	P.A. +	2	0	0	0	0	0	0	5
38	25-may-17	3175749	Tarragona	P.A. +	11	0	0	0	0	0	0	flora propia

39	29-may-17	3770523	Abreera	P.A. +	150	49	17	290,9	46	15	172,5	320
40	29-may-17	3770523	Abreera	P.A. +	15	4	1	5,2	5	1	6,3	32
41	29-may-17	3172982	Tarragona	P.A. +	180	49	29	579,4	48	28	396,8	390
42	18-sep-17	3894753	Tentudia	Muestra Ambiental 1	85	49	48	>2419,6	49	48	>2419,6	0
43	18-sep-17	3850103	Villamuriel de Cerrato	Muestra Ambiental 1	25	12	2	15,8	19	2	25,9	15
44	18-sep-17	3894749	Valverde de Llerena	Muestra Ambiental 2	85	20	1	26,2	22	3	32,3	0
45	18-sep-17	3772007	Jumilla	Muestra Ambiental 2	25	10	0	11	8	3	11,9	15
46	18-sep-17	3591194	Murcia	Muestra Ambiental 3	85	6	0	6,3	6	0	6,3	0
47	18-sep-17	3784338	Arroyo de la luz	Muestra Ambiental 3	25	11	2	14,5	16	1	20,1	16
48	18-sep-17	3850115	Dueñas	Muestra Ambiental 4	85	21	5	33,2	15	1	18,7	33
49	18-sep-17	3747672	Obarco	Muestra Ambiental 4	25	49	48	>2419,6	49	48	>2419,6	>400
50	18-sep-17	3850112	Dueñas	PA CECT 111	85	31	1	47,9	27	6	46,5	60
51	18-sep-17	3705986	Caramiñal	PA CECT 111	25	5	1	6,3	12	2	15,8	18
52	18-sep-17	3591769	Murcia	PA CECT 110	85	4	1	5,2	5	1	6,3	62
53	18-sep-17	3704626	Murcia	PA CECT 110	25	6	1	7,4	8	1	9,7	11
54	18-sep-17	3700345	Arzua	Muestra Ambiental 1	85	2	2	4,1	3	0	3,1	58
55	27-sep-17	3770535	Abreera	P.A. +	19	4	1	5,2	2	0	2	2
56	27-sep-17	3770355	Abreera	P.A. +	6	1	0	1	0	0	0	0
57	27-sep-17	3770537	Abreera	P.A. +	10	17	5	26,6	18	1	23,1	5
58	27-sep-17	3770536	Abreera	P.A. +	8	0	0	0	0	0	0	0
59	27-sep-17	3770354	Abreera	P.A. +	310	21	2	29,2	23	1	31,3	12
60	10-oct-17	3591179	Murcia	Muestra Ambiental 1	255	49	18	307,6	49	17	290,9	290
61	10-oct-17	3940464	Jumilla	Muestra Ambiental 1	75	35	5	66,3	39	10	93,4	52
62	10-oct-17	3707030	Jumilla	Muestra Ambiental 2	255	49	15	261,3	48	22	298,7	340
63	10-oct-17	3175752	Tarragona	Muestra Ambiental 2	75	38	7	81,6	36	2	63,7	75
64	10-oct-17	3707031	Jumilla	Muestra Ambiental 3	255	48	24	328,2	47	33	387,7	270
65	10-oct-17	3175751	Tarragona	Muestra Ambiental 3	75	48	13	201,4	47	21	240	142

66	10-oct-17	3682894	Arroyo de la luz	Muestra Ambiental 4	255	49	21	365,4	48	22	298,7	154
67	10-oct-17	3842122	Murcia	Muestra Ambiental 4	75	48	12	193,5	48	9	172,2	107
68	10-oct-17	3591203	Murcia	PA CECT 110	255	49	48	>2419,6	49	48	>2419,6	incontable
69	10-oct-17	3591204	Murcia	PA CECT 110	75	49	27	517,2	49	24	435,2	320
70	10-oct-17	3704627	Murcia	PA CECT 111	255	46	17	184,2	49	11	214,3	290
71	10-oct-17	3832715	Alicante	PA CECT 111	75	6	0	6,3	5	0	5,2	22
72	20-oct-17	3770354	Abreira	PA+	31	19	3	27,2	24	1	33,1	0
73	20-oct-17	3770355	Abreira	PA+		22	7	37,7	15	5	23,5	0
74	20-oct-17	3770535	Abreira	PA+	190	49	21	365,4	49	18	307,6	340
75	20-oct-17	3770536	Abreira	PA+	84	29	3	46,4	27	7	48,1	0
76	20-oct-17	3770537	Abreira	PA+	100	2	0	2	8	0	8,6	0



ANEXO IV. Datos primarios de muestras de arena.

DATOS PRIMARIOS											
MUESTRA	Fecha	Muestra	Origen	PA						Extracción	
				PSEUDALLERT				FM		Peso	Vol. Extracción
				Pocillos grandes	Pocillos pequeños	NMP/100mL	NMP/g	ufc/100mL	ufc/g (calculado)		
1	29-ago-17	1	Cala albufereta (1)	49	48	>2419,6		3		25	225
2	29-ago-17	2	Cala albufereta (2)	49	48	>2419,6		0		25	225
3	29-ago-17	3	Playa albufereta (3)	1	0	1	0,02	30	0,05	25	225
4	29-ago-17	4	Playa albufereta (4)	49	48	>2419,6		23		25	225
5	29-ago-17	5	Cala Almadraba (7)	49	48	>2419,6		0		25	225
6	29-ago-17	6	Cala almadraba (6)	49	48	>2419,6		0		25	225
7	29-ago-17	7	Playa San Juan (8)	0	0	0		0		25	225
8	29-ago-17	8	Playa San Juan (9)	49	48	>2419,6		0		25	225
9	29-ago-17	9	Playa San Juan (10)	1	0	1		10		25	225
10	24-oct-17	10	Cala Almadraba (7)	0	0	0		0		25	225
11	24-oct-17	11	Cala almadraba (6)	49	48	>2419,6		flora propia		25	225
12	24-oct-17	12	Playa albufereta (3)	0	0	0		0		25	225
13	24-oct-17	13	Playa albufereta (4)	0	1	1		flora propia		25	225
14	24-oct-17	14	Playa albufereta (5)	49	48	>2419,6		0		25	225
15	24-oct-17	15	Playa albufereta (3)	0	0	0		0		25	225
16	24-oct-17	16	Cala albufereta (1)	49	48	>2419,6		flora propia		25	225
17	24-oct-17	17	Cala albufereta (2)	49	48	>2419,6		0		25	225
18	16-sep-18	28	Cala albufereta (2)	49	47	2419,6	217,764	20	1,8	25	225
19	16-sep-18	28	Cala albufereta (2)	49	45	>2419,6		20		25	225
20	16-sep-18	29	Playa albufereta (3)	49	48	>2419,6		10		25	225

21	16-sep-18	29	Playa albufereta (3)	49	48	>2419,6		40		25	225
22	16-sep-18	29	Playa albufereta (3)	49	48	>2419,6		40		25	225
23	16-sep-18	29	Playa albufereta (3)	49	48	>2419,6		40		25	225
24	16-sep-18	30	Playa albufereta (4)	49	48	>2419,6		0		25	225
25	16-sep-18	30	Playa albufereta (4)	49	48	>2419,6		0		25	225
26	16-sep-18	30	Playa albufereta (4)	0	0	0		0		25	225
27	16-sep-18	30	Playa albufereta (4)	0	0	0		0		25	225
28	16-sep-18	31	Playa albufereta (5)	2	0	2	0,18	0		25	225
29	16-sep-18	31	Playa albufereta (5)	3	0	3,1	0,28	0		25	225



ANEXO V. Datos primarios de muestras de arena autoclavadas.

Muestra	Fecha	Muestra	Origen	PA	Valor intentado en 100 mL	PA									
						PSEUDALLERT R1				PSEUDALLERT R2				FM	
						Pocillos grandes	Pocillos pequeños	NMP/100mL	NMP/g	Pocillos grandes	Pocillos pequeños	NMP/100mL	NMP/g	ufc/100mL	ufc/g (calculado)
1	30-oct-17	18	Playa albufereta (3)	PA CECT 110	170	38	7	81,6	7,344	39	7	82	7,38	55	4,95
2	30-oct-17	19	Playa albufereta (5)	PA CECT 110	170	35	3	62,4	5,616	40	8	93,3	8,397	15	1,35
3	14-nov-17	20	Cala Almadraba (7)	Muestra Ambiental 4	200	7	0	7,5	0,675	6	0	6,3	0,567	22	1,98
4	14-nov-17	21	Cala almadraba (6)	Muestra Ambiental 4	200	47	9	155,3	13,977	6	0	6,3	0,567	54	4,86
5	14-nov-17	22	Playa albufereta (4)	Muestra Ambiental 4	200	41	5	90,6	8,154	1	0	1	0,09	30	2,7
6	22-feb-18	23	Playa albufereta (4)	PA CECT 110	4000	49	48	>2419,6		49	48	>2419,6		71*10 <sup>2</sup>	
7	22-feb-18	24	Playa albufereta (5)	PA CECT 111	400	19	6	31,1	2,799	20	4	30,1	2,709	4	0,36
8	22-feb-18	25	Playa albufereta (3)	PA CECT 111	400	41	7	95,9	8,631	error	error	error		5	0,45
9	22-feb-18	25	Playa albufereta (3)	PA CECT 110	1000	42	24	160,2	14,418	49	18	307,2	27,648	88	7,92
10	22-feb-18	26	Cala albufereta (1)	PA CECT 111	1000	45	15	157,6	14,184	1	0	1	0,09	17	1,53
11	22-feb-18	27	Cala albufereta (2)	PA CECT 110	400	2	4	6,1	0,549	1	13	14,2	1,278	42	3,78

