

Validación del método DryPlates®-YM

Jorge Sanchis Solera
Dpto. de Validaciones, Laboratorios Microkit.
jorge@microkit.es

Resumen

Las placas preparadas con medio deshidratado DryPlates® suponen una revolución para la industria por varios motivos: Se trata de un medio listo para su uso inmediato, pero al ser medio deshidratado, su caducidad es de nada menos que de un año desde fabricación (frente a los 1-3 meses de la placa preparada clásica). A diferencia de las placas clásicas, permite sembrar en masa, no solo en superficie, por lo que la muestra puede ser de hasta 1 ml. A diferencia de los tubos, frascos y botellas de agar, no se necesita perder una hora al día en hervir y enfriar el medio, además de ahorrarse el gravísimo punto crítico de la temperatura de adición del medio a la muestra que, si sobrepasa los 47 °C, impide el crecimiento de la mayor parte de la flora presente (falsos negativos). El diseño inicial con medio DRBC (Rosa Bengala) ISO 21527, objeto de la presente validación, y válido para alimentos, aguas y cosméticos, se ha visto después ampliado con los siguientes medios adicionales para hongos en formato DryPlates®: SDA para industria farmacéutica (Pharmacopea), SDA Caf para industria cosmética (ISO 16212) y alimentaria, Biggy para *Candida albicans* (ISO 18416), WL para industria cervecera, vitivinícola y de refrescos. Existen actualmente 27 medios de cultivo para todos los parámetros microbianos de alimentos, aguas, cosméticos y medicamentos en formato DryPlates®.

La validación se basa en estudios comparativos entre el método DryPlates®-YM y el método clásico con los más conocidos medios de cultivo para hongos (SDA/Sabouraud, SDA+Caf, YGC/Caf Glucose Agar, así como otro tipo de placas deshidratadas, de Japón) y se ve mensualmente revalidada mediante

los resultados de los participantes que las emplean en los intercomparativos SEILA de Microkit (alimentos, aguas y cosméticos), respecto a los resultados de los participantes que siguen empleando los medios en sus formatos clásicos.

Introducción

En anteriores publicaciones (véase www.microkit.es/publicaciones.htm) demostramos que el método DryPlates® funciona al menos, tan bien como el método clásico, en las validaciones de DryPlates® de recuento de aerobios, E.coli y demás coliformes y *Bacillus cereus*). Disponemos también de otras muchas validaciones de otros medios en este formato DryPlates®, publicadas en Google Drive-Manukit-Certificados.



Inoculación de las cepas en las muestras.

validación

Ello se debe principalmente a que este método patentado DryPlates® no es destructivo, de modo que el medio no sufre calentamientos, ni disoluciones/evaporaciones previas, ni adiciones de pegamentos... como sucede en otras placas similares, y es simplemente el mismo medio que emplean la mayoría de laboratorios en polvo, pulverizado sobre un disco de tejido impregnado en Hidragar, que permite la ge-

lificación a temperatura ambiente sin tener que hervir ni enfriar agares. El mismo ml de muestra lo hidrata en el momento de la siembra.

Presentamos los resultados de la validación de este medio para aislamiento y recuento de hongos DRBC ISO 21527 en formato DryPlates®.

Material y métodos

Tabla 1. Matrices empleadas.

Muestra 1- Carne picada (salchichas)	Muestra 11- Ensalada mixta	Muestra 21- Gel de baño
Muestra 2- Cereales con frutas rojas	Muestra 12- Huevos crudos	Muestra 22- Desodorante líquido bola
Muestra 3- Copos de puré de patatas	Muestra 13- Bollería rellena de chocolate	Muestra 23- Dentífrico infantil fresa
Muestra 4- Salsa César (aceite, limón, maíz, ajo, huevo, vinagre, pimienta, anchoas, soja, cebolla)	Muestra 14- Potito infantil (verdura-pollo)	Muestra 24- Leche protectora solar 20
Muestra 5- Judías con chorizo	Muestra 15- Marisco para paella	Muestra 25- Toallitas bebé
Muestra 6- Leche fresca entera	Muestra 16- Helado (nata con chocolate)	Muestra 26- Agua mineral envasada
Muestra 7- Queso loncheado	Muestra 17- Flan de huevo	Muestra 27- Agua del grifo
Muestra 8- Mix de embutidos (chorizo, jamón serrano, salchichón y lomo)	Muestra 18- Salsa romesco (frutos secos, ajos, tomate, aceite, ñoras, pan, vinagre, sal)	Muestra 28- Agua aire acondicionado
Muestra 9- Jamón york	Muestra 19- Mermelada de frambuesa	Muestra 29- Superficie (swabs)
Muestra 10- Boquerones en vinagre	Muestra 20- Paté a las finas hierbas	Muestra 30- Aire (sedimentación)

Tabla 2. Cepas inoculadas.

Cepas cuantitativas en lenticulas Microkit	Concentración y desviación certificadas
Moho <i>Aspergillus niger-brasilensis</i> WDCM 00053	3,00 ± 0,41 x 10 ⁵
Moho <i>Penicillium digitatum</i> salvaje identificado genéticamente	6,69 ± 1,94 x 10 ⁵
Levadura <i>Candida albicans</i> WDCM 00055	2,86 ± 158 x 10 ⁵
Levadura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> salvaje identificada genéticamente	4,56 ± 0,45 x 10 ⁶
Levadura <i>Zygosaccharomyces thermotolerans</i> salvaje identificada genéticamente en alimentos	3,23 ± 1,03 x 10 ⁴
Bacteria acompañante/interferente Gram positiva: <i>Bacillus siamensis</i> salvaje identificada genéticamente en alimentos	3,35 ± 1,25 x 10 ⁴
Bacteria acompañante/interferente Gram positiva: <i>Staphylococcus warneri</i> salvaje identificada genéticamente en cosméticos	1,72 ± 0,25 x 10 ⁶
Bacteria acompañante/interferente Gram negativa fermentadora: <i>Citrobacter freundii</i> WDCM 00077	3,27 ± 0,18 x 10 ⁵
Bacteria acompañante/interferente Gram negativa no fermentadora <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00114	7,24 ± 1,20 x 10 ⁶

validación



Diversidad de las matrices empleadas.

Resultados y conclusiones

Cualitativamente solo aparecen falsos negativos en las placas japonesas, y a un nivel sumamente inaceptable (más del 25% de las placas). Y los falsos positivos de microorganismos que no son hongos, son mínimos en DryPlates-YM (3,33 %) y en YGC (mismo 3,33%), subiendo a niveles inaceptables del 10% en SDA y del 16,67% en las placas japonesas. En SDA hay demasiadas confluencias de mohos que hacen incontables muchas de las placas. Además muchas de las presuntas levaduras son bacterias, dado el carácter no-selectivo de este medio; en YGC los crecimientos son lentos y con colonias muy pequeñas. En las placas japonesas hay demasiadas placas con falsos negativos, más aún de levaduras que de mohos; y muchos falsos positivos de bacterias, ya que hay colonias no filamentosas que no son verdes. También se observa muy escasa repetitividad en los pares de placas en dicho método. Los métodos con menos fallos (suma de incontables, falsos positivos y falsos negativos) han sido: YGC (23,33%) seguido muy de cerca por DryPlates-YM (26,67%). Les siguen muy de lejos las placas japonesas (60% de fallos) y el SDA (66,67% de fallos). Los crecimientos en DryPlates-YM han sido los más rápidos (menos de 48 horas, en solo 36 horas) de los tres medios sembrados en masa, tardando los otros más de 48 horas. Los resultados en número de colonias y en número

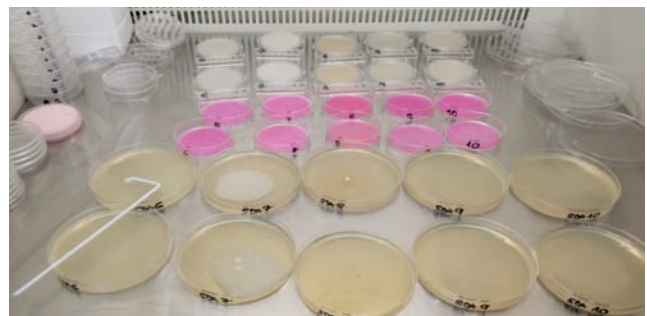
de fallos (placas incontables, falsos + y falsos -) son sumamente similares a los obtenidos en YGC y la rapidez de crecimientos es tan evidente como en SDA sembrada en superficie, pero sin los problemas de éste a la hora de las confluencias de mohos que hacen demasiadas placas incontables.

Cuantitativamente:

- Límites de cuantificación: el rango dentro del cual se puede contar los resultados de una placa sin estar sometidos a posibles interferencias ni imprecisiones, en hongos, en placa Petri de 90 mm, se suele aceptar que es de 15-150 colonias/placa; en DryPlates-YM, a pesar de su menor tamaño, también se han podido contar adecuadamente entre esos dos márgenes, ya que las colonias compiten por el sustrato y crecen de tamaños menores (no más lentas).
- Exactitud: cercanía de los resultados respecto al valor teórico (elegimos como valor asignado el valor inóculo en lugar del valor obtenido en los medios estándares, a causa de las interferencias antagónicas que han demostrado ciertos hongos con respecto a otros cuando estaban en el rango alto de recuento en placa). No obstante se estudia tanto la recuperación relativa (la obtenida respecto al valor inóculo) como la recuperación absoluta (la obtenida respecto a los medios estándares).

En las columnas amarillas se expresan las recuperaciones relativas de cada medio respecto al valor inóculo y en las columnas verdes la recuperaciones absolutas entre las DryPlates-YM y los demás medios (Tabla 3).

Concluimos ante ambas formas de medir la exactitud (relativa y absoluta), que las DryPlates®-YM obtienen una recuperación absoluta adecuada en todos los rangos. Esta validación demuestra también lo lejos que puede quedar el valor inóculo



Siembra de las muestras en las placas.

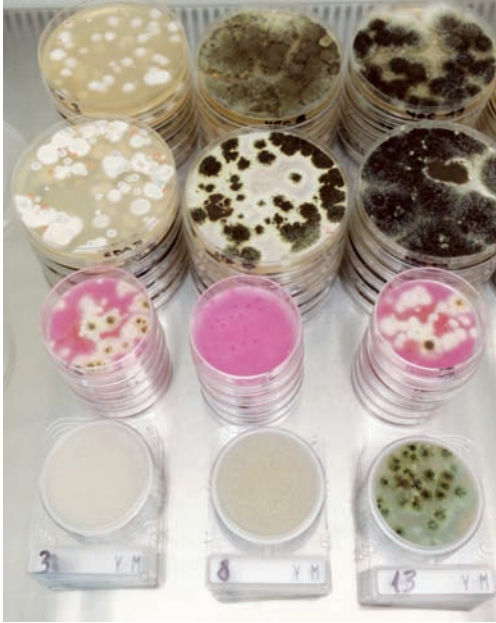
Tabla 3.

Recuento obtenido DryPlates-YM / Recuento esperado (inóculo)	Recuento obtenido SDA / Recuento esperado (inóculo)	Recuento obtenido YGC / Recuento esperado (inóculo)	Recuento obtenido CompactDry-YM / Recuento esperado (inóculo)	Exactitud DryPlates-YM / Exactitud SDA	Exactitud DryPlates-YM / Exactitud YGC	Exactitud DryPlates-YM / Exactitud CompactDry-YM
20,17 ± 16,34%	20,73 ± 19,88%	24,16 ± 10,37%	7,87 ± 7,75%	97,29%	83,49%	256,29%

validación

Tabla 4.

Dispersión CV% pares de placas DryPlates-YM	Dispersión CV% pares de placas SDA	Dispersión CV% pares de placas YGC	Dispersión CV% pares de placas CompactDry-YM
11,44% (16,58%)	8,98% (11,35%)	7,93% (12,12%)	21,69% (30,90%)



Recuentos comparativos.

lo real del valor obtenido (exactitud relativa), al menos en hongos (a pesar de haberse agitado inmediatamente antes de cada siembra de inóculo, para prevenir la fuga de los mohos a la superficie de la solución madre de la muestra), como se demuestra en los 4 métodos, dado que ninguno alcanza el 90% de recuperación habitualmente conseguida en otros parámetros de recuento total, ni siquiera el 70% de la generalmente alcanzada en medios selectivos ni el 50% habitual en medios muy selectivos. Nos movemos aquí alrededor de un 20-30% de recuperación relativa al valor inóculo según sea el medio empleado (excepto las placas japonesas, que, a pesar de la vistosidad de sus colonias, obtienen solo un 8%). El uso del medio DRBC en las DryPlates®-YM permite que los mohos invasores queden pequeños y no impidan el crecimiento y posterior recuento de mohos más lentos, como sí lo impiden a menudo en el SDA y en el YGC.

- Precisión: medida de dispersión de los resultados obtenidos respecto a su media.

Medimos tanto la repetitividad (grado de concordancia entre resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando, realizadas en las mismas condiciones de medición: tiempo, operario, muestras, laboratorio) como la reproducibilidad (grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando, realizadas en diferentes condiciones de medición: con el mismo método y la misma muestra, pero con distintos operarios, tiempo, instrumentos, laboratorios, etc.) (Tabla 4).

La mayor precisión (menor CV %) se ha dado en el rango alto del recuento en placa, resultando prácticamente el mismo valor en los otros rangos (medio y bajo). La precisión es excelente en DryPlates-YM (11,4% en las placas bien enumerables y 16,58% incluyendo las placas con mohos confluentes), inferior al 25% de la máxima exigencia, resultando todavía mejor en SDA y sobre todo en YGC. En las placas japonesas se obtiene un valor bastante superior, aún así admisible.

- Linealidad: grado de concordancia entre lo esperable (valor inóculo en ufc/ml) y lo detectado (valor obtenido en colonias/placa) en los diferentes rangos de recuento en placa.

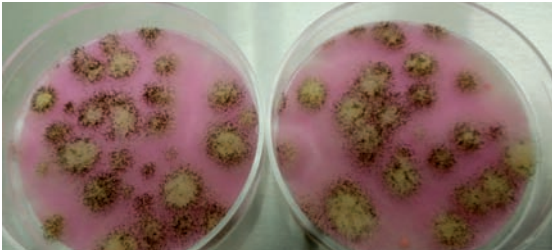
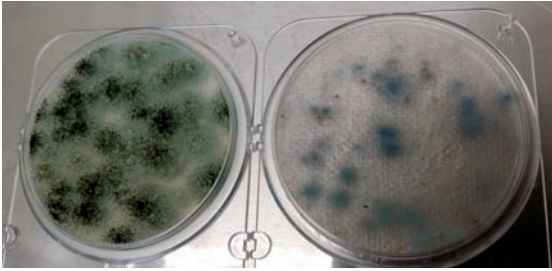
Como siempre suele suceder en microbiología, la linealidad es adecuada en los recuentos en placa, no observándose valores lejanos a lo esperado en nº ufc inoculadas/nº colonias obtenidas. No obstante en inóculos altos se ha perdido la linealidad, lo que demostraría que en hongos, el rango alto de recuento en placa debería ser inferior a las 150 colonias/placa habitualmente aceptadas.

- Selectividad inclusiva: escasez de falsos negativos empleando diferentes dianas.

No hay grandes diferencias entre las 5 dianas empleadas; y tomadas como suma de mohos por un lado y como suma de levaduras por otro, en el 83,33% de los casos han sido correctamente detectados ambos tipos de hongo por el método DryPlates-YM cuando estaban presentes en los diversos rangos y muestras; en SDA son correctamente detectados ambos tipos de hongos en el 80% de las muestras; en YGC también en el 80% de las muestras; en cambio en las placas japonesas solo se detectan ambos tipos de hongos en el 36,67% de las muestras, fallando muchas más veces las levaduras que los mohos, aunque estos también fallan gravemente como falsos negativos en este sistema, por lo que declaramos invalidadas dichas placas. No hay falsos negativos de hongos (suma de levaduras + mohos) ni en DryPlates-YM, ni en SDA ni en YGC, pero sí en el 20% de las placas japonesas. Se demuestra así la selectividad inclusiva para el método DryPlates-YM, superior incluso a la del SDA y a la del YGC, al evitar confluencias de mohos que enmascaran resultados de levaduras.

- Especificidad exclusiva: escasez de falsos positivos empleando diferentes interferentes.

En las muestras donde no estaban presentes los hongos, no han sido detectados sino excepcionalmente (en tales casos se trata de contaminaciones cruzadas, no de falsos positivos bacterianos, al tratarse de mohos en ambos casos). Aunque todos



**Repetitividad de pares, excelente en DryPlates®-YM
y no repetitiva en placas japonesas.**

los métodos obtienen falsos positivos en varias muestras, en YGC y en DryPlates-YM no pueden achacarse a errores de recuento en placa por mala interpretación de un crecimiento bacteriano, primero porque ambos medios son selectivos gracias al cloranfenicol (no crecen bacterias); y segundo, porque las colonias obtenidas eran claramente de mohos; por tanto, concluimos que los falsos positivos en estos dos medios son contaminaciones cruzadas. De modo que no observamos diferencias entre las diferentes bacterias interferentes, que en el 100% de los casos han sido correctamente descartados cuando estaban presentes en cualquier rango. Se demuestra así la especificidad exclusiva para el método DryPlates-YM y para el YGC. Sin embargo aparecen falsos positivos de las bacterias acompañantes tanto en SDA como en las japonesas.

- Robustez del parámetro: Denominamos así la capacidad del parámetro Recuento de hongos (levaduras y mohos) para obtener una elevada precisión de los resultados obtenidos entre los diferentes métodos/medios ensayados.

Se observa excelente entre el SDA (0,47%), el YGC (1,52%) y las DryPlates-YM (1,99%); en cambio las placas japonesas discrepan de las 3 anteriores en un 12,24% y además fallan en demasiadas ocasiones (20% de resultados falsamente negativos), lo cual las invalida.

Por todo ello (el 100% de parámetros que miden la calidad de un método), y por la inmensa facilidad de empleo y ahorro de tiempo y de trabajo que suponen, recomendamos, sin ninguna duda, por encima de cualquier otro método, el uso de las DryPlates®-YM en todo tipo de muestras de alimentos, cosméticos, aguas, superficies y aire.

www.microkit.es

(Véase anuncio en la sección Guía del Comprador.)