

Validación del Cromokit-X-Staph Agar para detección y recuento de *Staphylococcus aureus* en alimentos, aguas y cosméticos

Jorge Sanchis¹

¹ Dpto. I+D Laboratorios MICROKIT, Madrid, España, microkit@microkit.es

Se describe cómo ha sido validado el medio de cultivo cromogénico Cromokit X-Staph Agar en todo tipo de muestras alimentarias, cosméticas y ambientales. Existe una validación similar específica de este medio en formato DryPlates, con resultados muy similares.

Palabras clave. Baird-Parker, DryPlates X-Staph, Mannitol Salt Agar, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

Los resultados obtenidos a lo largo de los últimos 15 años de servicios de aseguramiento externo de la calidad de los laboratorios (servicios intercomparativos SELLA), demuestran que los medios de cultivo empleados por la mayoría de laboratorios para detección y/o recuento de *Staphylococcus aureus* (Baird-Parker, RPF, Mannitol Salt Agar) generan una proporción aterradora de resultados falsamente positivos y falsamente negativos, de modo que este microorganismo es probablemente el parámetro más problemático actual de detección en la microbiología alimentaria. Tras varios años y mejoras, Laboratorios MICROKIT lanza al mercado la solución a todos estos fallos, el agar cromogénico Cromokit-X-Staph.

Entre septiembre de 2007 y julio de 2013 comparamos un total de 480 muestras de 24 intercomparativos en los ensayos Seilalimentos, Seilagua y Seilaparfum y además se evalúan internamente los medios con cepas de referencia cuantitativas para el parámetro de *Staphylococcus aureus*, tanto en matrices alimentarias como en matrices cosméticas siguiendo el método MICROKIT® mediante el medio Cromokit-X-Staph Agar, con respecto al método oficial (Normas Técnicas oficiales vigentes para microbiología): UNE 11133-2 de control de calidad de medios de cultivo, Baird-Parker según Norma ISO 6888-1 de alimentos (con o sin RPF) e ISO 22718 de cosméticos, Mannitol Salt Agar según Pharmacopea e ISO 22718 de cosméticos y con cepas cuantitativas de referencia diana, interferentes y acompañantes.

El nuevo sistema validado tiene grandes ventajas sobre el método clásico, al incorporar un cromógeno muy específico del microorganismo diana que ahorra las grandes cantidades de resultados falsamente positivos y falsamente negativos de los medios de referencia (Baird-Parker con o sin RPF y Mannitol Salt Agar), de modo que ahorra confirmaciones completamente innecesarias en colonias que no son de las características de las diana (azules, brillantes, pequeñas a las 24 h de incubación). Esto ahorra

mucha manipulación, kits y galerías de confirmación, así como el tiempo de trabajo que todo ello supone.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se comparan los recuentos obtenidos en Cromokit X-Staph Agar con respecto a los demás medios de uso habitual para detección de *S. aureus*, indicados en la Introducción. Para ello, se emplean cepas cuantitativas (lentículas MICROKIT desde colección WDCM) de los microorganismos más variados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los últimos 24 ensayos intercomparativos (24 matrices, más de 480 muestras repartidas entre más de 60 laboratorios) se pone en evidencia que el uso del medio Cromokit X-Staph Agar en cualquiera de sus presentaciones (medio deshidratado, placas, tubos y frascos preparados, DryPlates-XStaph), no genera ningún falso negativo ni ningún falso positivo, por lo que su sensibilidad sería del 100%, su especificidad del 100% y su eficacia del 100%. Frente a una sensibilidad del Baird-Parker del 68,1%, del RPF todavía peor: del 61,9 % y del Mannitol Salt Agar del 95%; y a una especificidad del Baird-Parker del 78,2%, del RPF todavía peor: del 72,38% y del Mannitol Salt Agar del 100%.

Por otra parte, estudiamos internamente los parámetros estándar de validación cualitativa y cuantitativa con lectura de resultados de las placas a las 24-48 h, añadiendo a las cepas diana (*S. aureus*) varias interferentes (*S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*) y acompañantes (*E. coli*, *Bacillus cereus*), en 20 matrices alimentarias y en 40 matrices cosméticas:

Sensibilidad: Obtenemos un 10 % de falsos negativos en Baird-Parker, que queda así invalidado. Un 5% de falsos negativos en Mannitol Salt Agar que es exactamente el valor máximo tolerable para dar por correcto el resultado de sensibilidad. Y un 0% en Cromokit X-Staph Agar, lo que demuestra que es el mejor medio.

Especificidad: Obtenemos un 5% de falsos positivos en Baird-Parker, y un 0% de falsos positivos

tanto en Mannitol Salt Agar como en Cromokit X-Staph, por lo que damos por correcto el resultado de la especificidad en los tres medios, al ser tolerado hasta un 5%.

En cuanto al límite de detección, ya quedaría demostrado que es al menos el del valor diana inoculado en las muestras del estudio sensibilidad/especificidad. Sin embargo, en el intento de mejorarlo con cepa diana a cada vez menos concentración, los resultados son:

Staph. aureus	Acrompatantes + interferentes	Nº Muestras	Detección en Baird-Parker	Detección en MSA	Detección en Cromokit-X-Staph Agar
4,8 ± 0,6 ufc/indculo	186 ± 11,9 ufc/indculo	20	10/20	15/20	16/20
7,2 ± 0,9 ufc/indculo	186 ± 11,9 ufc/indculo	20	15/20	17/20	19/20
9,6 ± 1,2 ufc/indculo	186 ± 11,9 ufc/indculo	20	19/20	20/20	20/20

Por lo que el límite de detección que hemos sido capaces de demostrar en el 100% de muestras es 9,6 ± 1,2 en Cromokit-X-Staph Agar y lo mismo en Mannitol Salt Agar. Por debajo de este valor, son simplemente la incertidumbre microbiológica y el conocido reparto heterogéneo de las muestras microbiológicas, los que no nos dejan detectar en el 100% de las muestras, lo cual no significa que nuestro límite REAL de detección no sea inferior al 9,6 ± 1,2 demostrado (como se observa en las muestras de 4,8 ± 0,6 y de 7,2 ± 0,9 ufc/inóculo en las cuales sí detectamos, aunque siempre más veces en Cromokit-X-Staph Agar que en los otros medios), sino que en las submuestras en que no detectamos, lo más probable es que no hubiera llegado a entrar microorganismo diana.

Exactitud:

Rango de recuento en placa Baird-Parker	media	desviación	exactitud
Bajo	19,15	± 1,95	112,6 %
Medio	33,10	± 3,53	64,90 %
Alto	91,90	± 8,63	77,20 %
Rango de recuento en placa MSA	media	desviación	exactitud
Bajo	19,97	± 1,56	117,42 %
Medio	35,60	± 3,12	69,80 %
Alto	93,70	± 5,59	78,71 %
Rango de recuento en placa Cromokit-X-Staph	media	desviación	exactitud
Bajo	21,30	± 1,34	125,9 %
Medio	39,00	± 2,29	76,40 %
Alto	100,7	± 4,83	84,60 %

Los tres medios recuperan un número adecuado de colonias respecto a la cepa diana de referencia en los tres rangos de recuento en placa (>50% tratándose de

medios selectivos), si bien destaca por encima el Cromokit-X-Staph Agar (>75% en los tres rangos) seguido del Mannitol Salt Agar y por último el Baird-Parker.

Precisión:

Rango de recuento en placa	CV% Baird Parker	CV% Mannitol Salt Agar	CV% Cromokit-X-Staph Agar
Bajo	10,18 %	7,80 %	6,29 %
Medio	10,66 %	8,76 %	5,87 %
Alto	9,00 %	5,96 %	4,80 %

Se observa que la precisión ha sido similar en los 3 rangos. La precisión es excelente en los tres medios, aunque por algún motivo ha resultado algo mejor en Cromokit-X-Staph Agar y secundariamente en Mannitol Salt Agar.

Facilidad de interpretación. Las colonias de *S. aureus* en este medio son azul oscuro (indigo) aunque comienzan siendo púrpura (burdeos), sin tener que añadir suplementos de yema de huevo con telurito ni tener que observar halos que a tantos errores llevan; la gran ventaja adicional es que ya aparecen, pequeñas como como puntas de afiler, en las primeras 24 h, sin tener que esperar las 48 h del método estándar. Las colonias de otras especies de estafilococos crecen pequeñas pero azul claro (turquesa). En alimentos con alta flora acompañante de *Bacillus*, debe añadirse polimixina, para ahorrarse la aparición de las colonias de *Bacillus* (grandes y de color turquesa).

Para detección de estafilococos coagulasa positivos, simplemente realizar el látex a las colonias pequeñas azul oscuro (*S. aureus*) y si se desea, también a las colonias azul claro (otros *Staphylococcus* spp. que podrían ser coagulasa positivos).

CONCLUSIONES

Queda validado el medio Cromokit-X-Staph Agar como el mejor para detección de *S. aureus*, sin los falsos positivos ni los falsos negativos de los medios clásicos. Desde su lanzamiento en Octubre de 2012, numerosos laboratorios han cambiado ya a este medio. Y su participación en ensayos intercomparativos como SELLA vuelve a revalidarlo, al demostrar, ronda tras ronda, que es el medio más adecuado para la correcta detección de *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos, de aguas y de cosméticos.

BIBLIOGRAFÍA

Sanchis, J. (2009). Validación de los protocolos MICROKIT para análisis microbiológico de alimentos frente a la normativa relacionada, mediante los ensayos intercomparativos Seilalimentos. *Técnicas de Laboratorio 341. Lifescienceslab 5*.