

Validación de las DryPlates-TC para recuento de aerobios

Jorge Sanchis¹

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

Se describe cómo han sido validadas las placas preparadas de medio PCA deshidratado (DryPlates-TC) en todo tipo de muestras alimentarias, cosméticas y ambientales. Existe otra validación similar de las DryPlates-TC-Water preparadas con medio Nutritivo YEA (PCA-Water) para uso en aguas.

Palabras clave. Aerobios, DryPlates, ISO 11133-2, PCA, TSA, WDCM.

INTRODUCCIÓN

Entre junio de 2012 y julio de 2013 se compara durante su diseño final un total de 450 muestras con cepas de referencia cuantitativas para el parámetro de recuento total de aerobios, siguiendo el método MICROKIT® mediante DryPlates®-TC, con respecto al método oficial (Normas Técnicas oficiales vigentes para microbiología): Standard Methods ISO 4833 alimentos (Plate Count Agar), ISO 6222 aguas (Yeast Extract Nutrient Agar), ISO 21149 cosméticos (TSA), Pharmacopea (Medium B Tryptic Soy Agar TSA) e ISO 11133-2 sobre control de la fertilidad de los medios de cultivo cuantitativos (TSA).

El nuevo sistema validado tiene grandes ventajas sobre el método clásico, al tratarse de placas preparadas pero deshidratadas (2 años de caducidad), que absorben en masa y en frío 1 ml de muestra (a diferencia de las placas preparadas clásicas), lo que ahorra el punto crítico de la fusión de agares del método tradicional para siembra en masa, así como mucha manipulación y tiempo de trabajo. Además, tiene grandes ventajas sobre otros sistemas similares, al no necesitar aplicadores para homogeneizar la mezcla de muestra con el medio (por autodifusión natural de la muestra) y al incluir el soporte una fibra de malla muy fina, que permite obtener colonias con aspectos idénticos a los de las colonias crecidas en medios agarizados clásicos.

En octubre de 2013 se realiza de nuevo una comparativa doble del recuento obtenido en DryPlates-TC con respecto al obtenido en TSA (en esta ocasión siembra en superficie) y al certificado, en las 38 cepas cuantitativas variadas disponibles en nuestro laboratorio. En abril de 2014 se realiza de nuevo una comparativa doble del recuento obtenido en DryPlates-TC con respecto al obtenido en CompactDryPlates-TC en mezclas de diferentes cepas cuantitativas variadas disponibles en nuestro laboratorio. En agosto de 2014 se confirma con 30 tipos diferentes de muestras (20 alimentos, 8 cosméticos y ambientes interiores) si el método de recuento de AEROBIOS con DryPlates-TC los detecta y enumera adecuadamente. Es decir, se comprueba si

esta técnica es idónea en muestras naturales, con resultados aptos y fiables.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se comparan los recuentos obtenidos en DryPlates-TC con los obtenidos en todo tipo de medios de cultivo de recuento de aerobios, indicados en la Introducción. Para ello, se emplean cepas cuantitativas (lentículas MICROKIT desde colección WDCM) de los microorganismos más variados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos a las 18 horas son mucho más favorables para las DryPlates®-TC que para cualquier otro método, ya que el cromógeno permite ver las colonias rojas mucho antes que las incoloras de los medios estándar, lo cual se convierte en una ventaja competitiva del método validado, con recuentos todavía no fiables; pero que ya alertan del peligro de esas muestras. Los datos a las 72 horas no difieren prácticamente de los datos a las 48 horas. En floras mixtas de aerobios, se obtiene una recuperación media en DryPlates®-TC del 700% en las primeras 18 horas de incubación y del 112% a las 48 y 72 horas.

En la comparativa con TSA sembrado en superficie, la exactitud absoluta resulta del 95,37% DryPlates-TC/TSA, también superior al 90% que exigen los estándares de calidad. En la comparativa con CompactDryPlates-TC, la exactitud absoluta resulta del 100%, al no haber diferencias en las medias de los recuentos de ambos métodos.

En muestras naturales, la exactitud relativa es del 155% y la absoluta entre los diferentes medios varía entre 113-168%: las DryPlates-TC obtienen una recuperación absoluta excelente en todos los rangos de recuento en placa, concretamente la máxima de los 4 métodos comparados.

El método con menos fallos (suma de incontables, lecturas confusas y falsos negativos) ha sido el de las DryPlates-TC (6,67%) seguido de cerca por el TSA y el PCA cromogénico (ambos con 10%). Les siguen muy de lejos las CompactDry-TC (53,33% de fallos). Sólo aparecen falsos negativos en CompactDry-TC, y a un

nivel sumamente inaceptable (16,67 % de las muestras).

| Exactitud por rangos | DryPlates-TC / PCA crom | DryPlates-TC / TSA | DryPlates-TC / CompactDry |
|----------------------|-------------------------|--------------------|---------------------------|
| Rango 15 ufc/ml | 150% | 170% | (147,5%) |
| Rango 37 ufc/ml | 113,2% | 126,8% | 128,7% |
| Rango 75 ufc/ml | 100,1% | 108,7% | 139,3% |
| Rango 112 ufc/ml | 107,9% | 120,4% | 349,5% |
| Rango 150 ufc/ml | (97,1%) | (116%) | ... |

A pesar del menor tamaño de placa, el rango de recuento en placa para las DryPlates®-TC se amplía desmesuradamente en el límite superior de cuantificación respecto a las 200 colonias/placa del método tradicional con medios agarizados clásicos, a causa de la mejor visibilidad de las colonias en contraste con el medio y con las partículas de muestra (hemos sido capaces de contar perfectamente placas con 377 colonias). Los datos en recuentos bajos son mucho más favorables para las DryPlates®-TC que para los medios de referencia, lo que permite emplearlas con más efectividad en materias con recuentos bajos.

En general y salvo excepciones en algunas cepas, las Dry-Plates®-TC igualan o incluso MEJORAN los resultados analíticos de los métodos clásicos de referencia para recuento total de aerobios, de modo que el método Dry-Plates® TC de MICROKIT® resulta significativamente más exacto que el método clásico de referencia. Parece haber dos motivos: el ahorro del punto crítico de la siembra en masa por refusión de agares, que en el método clásico, a menudo convierte en inviabilidades, por exceso de calor, a los microorganismos diana; y la confusión de colonias con partículas de alimento en el método clásico.

Las réplicas realizadas tanto en triplicados de placas de ambos métodos como en repeticiones en diferentes días, no arrojan diferencias significativas entre ambos métodos. La precisión detectada en CV% para las DryPlates-TC es del 11,84%, excelente cuando las entidades más estrictas de validación admiten hasta un 25%. Los otros métodos arrojan CV% del 18,17% (TSA), 15,51% (PCA cromogénico) y 24,90% (CompactDry-TC).

La linealidad en los diferentes rangos es correcta en todos los métodos. No han aparecido falsos negativos, lo que demuestra una sensibilidad inclusiva del 100% para el método DryPlates®-TC. No procede hablar de falsos positivos ni por tanto de especificidad

exclusiva en un método de recuento total de aerobios.

CONCLUSIONES

Por todo ello, quedan VALIDADAS las Dry-Plates® TC para recuento de aerobios, ya que con sus datos de validación demuestran ser, no sólo la forma más cómoda y práctica de trabajar en microbiología, sino además la más fiable. La mayor facilidad de uso de este método permite realizar muchas más muestras en menos tiempo, a la vez que se disminuye el número de puntos críticos del análisis y por tanto se aumenta su robustez incluso para usuarios poco acostumbrados a su manejo o a las técnicas microbiológicas. Recomendamos también este método para obtener resultados de screening negativo en urgencias y para muestras con baja carga microbiana, como son las aguas de consumo humano y los cosméticos. Las DryPlates-TC, junto con las CompactDry-TC son el método más cómodo y fácil de emplear, y que menos manipulaciones requiere, permitiendo el paso de la muestra a la estufa en cuestión de segundos. Aunque las segundas sean incluso más cómodas de emplear que las primeras, al no tener que añadir el disco nutritivo después de la muestra, lamentablemente no cumplen los criterios más básicos de exactitud e inclusividad, por lo que quedan invalidadas. El uso del método clásico por fusión y enfriamiento de agares se lleva horas de trabajo, desde la muestra hasta la estufa; aparte del punto crítico de correr el riesgo de añadir el agar demasiado caliente a la muestra por parte de operarios poco expertos o con muchas prisas, e impedir así el crecimiento de una elevada proporción (o la totalidad) de la flora cultivable presente. El uso de placa preparada convencional supone también mucho más trabajo que en DryPlates-TC, al tener que repartir con asas Drigalsky la muestra sembrada en superficie, esperar varios minutos a que la muestra se embeba completamente antes de incubar la placa invertida...; y más costoso al tener que emplear al menos 3 placas por cada 1 ml de muestra.

Desde su lanzamiento a finales de 2013, numerosos laboratorios emplean ya este método. Y su participación en ensayos intercomparativos como SEILA vuelve a revalidarlas al demostrar, ronda tras ronda, que es el método más adecuado para recuento de aerobios en muestras de alimentos 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 Seitalimentos. *Técnicas de Laboratorio 341. Lifescienceslab 5.*