

# Recuento de hongos (levaduras y mohos) en el laboratorio cosmético: método rápido Rapid YM Agar frente a método clásico Sabouraud (resumen)

## Laboratorios Microkit

### 1. Objetivos

Comprobar si el método de recuento de hongos (levaduras y mohos) propuesto con Rapid YM Agar de Microkit (Ref. deshidratado DMT243, placas preparadas ECOPRYM, DryPlates DPPRYM) iguala o mejora la rapidez de obtención de resultados respecto al método estándar empleado hasta ahora en la mayoría de los laboratorios de análisis microbiológicos de productos cosméticos (Sabouraud SDA con Caf y con o sin gentamicina), y verificar si los detecta y enumera adecuadamente en las muestras procesadas. Es decir, comprobar que la técnica propuesta frente a la utilizada, los medios de cultivo utilizados y los analistas que intervienen en el control rutinario de recuento de hongos son idóneos, con resultados aptos y fiables, determinados mediante la exactitud y la precisión de nuestro método en los rangos de trabajo habituales.

Si el medio Rapid YM Agar a 35 °C es 2-3 días más rápido que el SDA clásico a 25 °C (5 días), con recuentos significativamente similares y como, además, en la anterior validación del recuento de aerobios, el medio propuesto PCA/TSA cromogénico también fue más rápido (2-3 días) que el estándar (TSA) a 2 y 5 días con recuentos significativamente similares, entonces podremos ahorrar tiempo en la liberación de nuestros lotes, ya que los demás parámetros (patógenos) tardan entre 3 y 4 días.

El parámetro objeto de la presente validación es el recuento de hongos (levaduras y mohos) reduciendo, gracias al Rapid YM Agar de Microkit, el tiempo de incubación de 5 días a solo 2-3 días (36-72 horas). Los hongos saprófitos que crecen a 25 °C son el indicador de la microbiota alterativa cuando el producto se va a almacenar a temperatura ambiente (primavera-otoño en países templados como España, incluso verano en países de latitudes altas). En cambio, los hongos patógenos y saprófitos que crecen a 35 °C (en verano) son un indicador de la microbiota asociada al hombre, pero en este medio la mayoría de los hongos que crecen a 25 °C también crecen a 35 °C (igual que los hongos fuera de medios de cultivo también crecen en verano), lo cual amplía el rango de especies

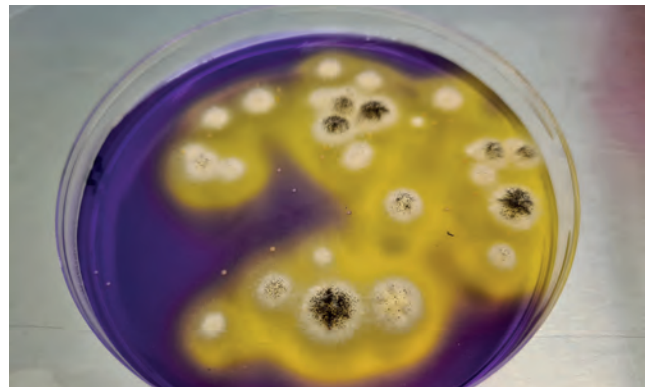
fúngicas alterativas, lo que permite que los recuentos, además de más rápidos, sean más altos y, por ello, más cercanos a la realidad.

### 2. Logística

El experimento se diseña con 30 muestras de diferentes cosméticos, inoculadas con diferentes combinaciones de microorganismos, triplicando en los tres rangos de recuento en placa (bajo, medio y alto): tres cepas de hongos (un moho: *Aspergillus niger brasiliensis* WDCM00053 y dos levaduras: *Candida albicans* WDCM00054 y la salvaje *Rhodotorula mucilaginosa* MKTM-R001). Se añaden dos bacterias interferentes, que a menudo hacen sinergia para hacerse resistentes al cloranfenicol: *Pseudomonas aeruginosa* WDCM00025 y la salvaje *Staphylococcus hominis* PECJJT.

El procedimiento es el método de pares, empleando por cada muestra dos placas de Sabouraud y dos de Rapid YM Agar, de modo que se comparan 360 placas (90x2 de Sabouraud y 90x2 de Rapid YM).

La concentración teórica de los distintos microorganismos inoculados en las muestras se recoge en la Tabla 1.



A. niger sin la confluencia del Sabouraud + Rhodotorula 36 horas

## validación cuantitativa

Rango	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Rhodototula mucilaginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
Bajo	1-9	1-9	1-9	<15	<15
Medio	10-18	10-18	10-18	20-50	20-50
Alto	18-90	18-90	18-90	70-200	68-200

**Tabla 1**

- Por cada muestra realizamos cuatro ensayos: dos en SDA por siembra en superficie de 0,2 mL y extensión con asa Digralsky y otros dos en Rapid YM Agar también por siembra en superficie de 0,2 mL y extensión con asa Digralsky. Ambos medios se incuban (introduciéndolas a la vez en cada estufa) a 20-25 °C durante 5 días para el Sabouraud, y a 30-35 °C

durante 2 y 3 días para el Rapid YM Agar.

- Transcurrido el tiempo de incubación se hace el recuento de las colonias en cada una de las placas de cultivo.

Se estudian los blancos de muestras sin cepas y los negros de cepas sin muestra para confirmar que no haya datos aberrantes a causa de las muestras o de las cepas.

### 3. Resultados

#### 3.1 Rango bajo (placas duplicadas de la dilución madre (-1))

Muestra	Cepa	Valor inóculo teórico	SDA Caf+G 5 días	Rapid YM Agar 2 días	Rapid YM Agar 3 días
1	<i>Aspergillus</i>	1*	4,3	1,6	2,8
2	<i>Candida</i>	1*	9,12	9,6	9,9
3	<i>Rhodotorula</i>	1*	10,10	12,14	15,15
4	<i>Aspergillus</i>	2*	25,24	0,0	0,0
5	<i>Candida</i>	2*	1,2	18,18	19,22
6	<i>Rhodotorula</i>	2*	10,11	1,1	1,1
7	<i>Aspergillus</i>	3	13,10	13,10	13,10
8	<i>Candida</i>	3	1,3	3,4	3,5
9	<i>Rhodotorula</i>	3	3,3	2,3	2,3
10	<i>Aspergillus</i>	4	14,11	15,15	15,15
11	<i>Candida</i>	4	3,1	3,3	4,3
12	<i>Rhodotorula</i>	4	5,5	2,3	2,3
13	<i>Aspergillus</i>	5	18,18	14,19	16,21
14	<i>Candida</i>	5	4,5	7,6	8,6
15	<i>Rhodotorula</i>	5	3,4	6,7	7,10
16	<i>Aspergillus</i>	6	12,20	20,21	21,20
17	<i>Candida</i>	6	3,6	2,6	2,9
18	<i>Rhodotorula</i>	6	9,8	10,4	11,4
19	<i>Aspergillus</i>	7	22,15	20,19	19,20
20	<i>Candida</i>	7	8,3	7,10	7,10
21	<i>Rhodotorula</i>	7*	1,0	0,0	0,0
22	<i>Aspergillus</i>	8	30,28	28,23	29,26
23	<i>Candida</i>	8	5,16	6,8	6,8
24	<i>Rhodotorula</i>	8	11,16	9,16	9,17
25	<i>Aspergillus</i>	9	24,12	20,21	23,26
26	<i>Candida</i>	9	16,7	3,7	3,8
27	<i>Rhodotorula</i>	9	5,6	6,3	7,4
28	<i>Pseudomonas</i>	(18)	0,0	0,0	0,0
29	<i>Staphylococcus</i>	(15)	0,0	0,0	0,0
30	<i>Pseud + Staph</i>	(33)*	168,200	96,106	146,116
Σ ambas placas hongos			406	404	435
Comparativa total (En rojo los resultados descartados como aberrantes)				99,51% del SDA en 5 días, prácticamente idéntico	107,14% más que el SDA en 5 días y 107,67% más que Rapid YM en 2 días

## validación cuantitativa

En este rango bajo, a igualdad de inóculos, el Rapid YM Agar obtiene en solo dos días el 99,5% de las colonias que el SDA en 5 días. Y en solo 3 días, obtiene el 108% de las colonias que el SDA en cinco. De modo que ambos tiempos de incubación del Rapid YM son equivalentes al método clásico de 5 días en SDA, no hace falta esperar 5 días en el recuento de hongos con SDA, ni siquiera 3 días con Rapid YM, y con 2 días es suficiente, ya que en microbiología se acepta que recuperaciones superiores al 95% en los recuentos, equivalen al 100%, por lo que perfectamente ya lo podríamos sustituir sin necesidad de observar lo que ocurre en los rangos medio y alto, que son menos significativos en microbiología cosmética a causa de los máximos normativos.

En el rango medio (tabla inferior), a igualdad de inóculos, el Rapid YM Agar obtiene en solo 2 días más colonias (108%) que el SDA en 5. Casi un 10% más de colonias. Y en solo 3 días obtiene el 120% de las colonias que el SDA en 5 días, lo cual ya es una diferencia muy significativa (20% superior), de modo que ambos tiempos de

incubación del Rapid YM son equivalentes al método clásico de 5 días en SDA, no hace falta esperar 5 días en el recuento de hongos con SDA, ni siquiera 3 con Rapid YM, y con 2 días es suficiente.

En el rango alto (tabla de la página siguiente), a igualdad de inóculos, el Rapid YM Agar obtiene en solo 2 días más colonias (136%) que el SDA en 5. ¡Un 36% más de colonias! Y en solo 3 días, obtiene el 149% de las colonias que el SDA en 5 días, lo cual ya es una diferencia muy significativa (49% superior), de modo que ambos tiempos de incubación del Rapid YM son equivalentes al método clásico de 5 días en SDA, no hace falta esperar 5 días en el recuento de hongos con SDA, ni siquiera 3 con Rapid YM, y con 2 días es suficiente.

Nota: Curiosa demostración de la sinergia entre una bacteria gram positiva y una gram negativa para, juntas, combatir la presencia de cloranfenicol y hacerse viables, cuando, por separado, queda claro que no crecen en estos medios con CAF y las muestras donde las inoculamos por separado sirven de blancos sin hongos.

### 3.2 Rango medio (placas duplicadas de la dilución madre (-1))

Muestra	Cepa	Valor inóculo	SDA Caf+G 5 días	Rapid YM Agar 2 días	Rapid YM Agar 3 días
31	Aspergillus	10	24,20	17,30	23,32
32	Candida	10	8,8	4,12	5,12
33	Rhodotorula	10	8,12	9,9	10,9
34	Pseudomonas	(38)	0,0	1,1	1,1
35	Staphylococcus	(30)	0,0	1,1	1,1
36	Pseud + Staph	(68)	0,0	1,1	1,1
37	Aspergillus	11	30,25	36,30	38,40
38	Candida	11	4,9	7,4	10,4
39	Rhodotorula	11	16,13	1,11	12,12
40	Aspergillus	12	31,23	27,34	32,35
41	Candida	12	12,6	13,6	13,6
42	Rhodotorula	12	13,13	13,17	13,19
43	Aspergillus	13	25,24	24,27	26,33
44	Candida	13	8,16	6,13	6,13
45	Rhodotorula	13	11,18	13,13	13,13
46	Aspergillus	14	32,30	35,28	37,28
47	Candida	14	7,10	10,10	11,10
48	Rhodotorula	14	13,19	17,16	19,16
49	Aspergillus	15	28,27	35,38	40,44
50	Candida	15	16,10	15,18	15,18
51	Rhodotorula	15*	3,1	0,0	0,0
52	Aspergillus	16	30,37	27,45	34,53
53	Candida	16	15,11	21,14	24,16
54	Rhodotorula	16	32,22	30,23	35,26
55	Aspergillus	17	30,36	45,37	46,41
56	Candida	17	15,18	11,15	13,16
57	Rhodotorula	17	14,13	7,10	7,12
58	Aspergillus	18	19,14	36,28	37,30
59	Candida	18	21,19	22,23	23,17
60	Rhodotorula	18*	292,240	384,432	393,460
Σ ambas placas hongos			915	992	1.097
Comparativa total (En rojo los resultados descartados como aberrantes)				108,42% por encima del SDA en 5 días	119,89% más que el SDA en 5 días y 110,58% más que Rapid YM en 2 días

## validación cuantitativa

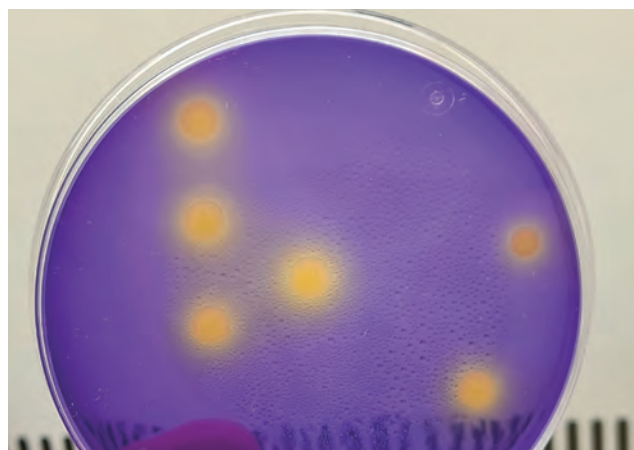
### 3.3 Rango alto (placas duplicadas de la dilución madre (-1))

Muestra	Cepa	Valor inóculo	SDA Caf+G 5 días	Rapid YM Agar 2 días	Rapid YM Agar 3 días
61	Aspergillus	20	17,20	49,55	49,55
62	Candida	20	17,12	8,19	9,22
63	Rhodotorula	20	5,14	26,29	27,29
64	Aspergillus	22*	0,0	0,0	0,0
65	Candida	22	6,15	9,14	9,15
66	Rhodotorula	22	23,18	18,17	18,17
67	Aspergillus	24	32,29	49,42	49,43
68	Candida	24	21,16	16,23	18,26
69	Rhodotorula	24	24,37	20,17	20,20
70	Aspergillus	26	34,38	41,54	44,64
71	Candida	26	21,13	23,21	27,24
72	Rhodotorula	26	28,22	29,14	31,18
73	Aspergillus	28	46,38	55,61	55,64
74	Candida	28	12,24	14,16	16,23
75	Rhodotorula	28	21,24	20,18	28,18
76	Pseudomonas	(54)	0,0	0,0	0,0
77	Staphylococcus	(45)	0,0	0,0	0,0
78	Pseud + Staph	(99)	0,0	0,0	0,0
79	Aspergillus	30	42,40	72,76	80,76
80	Candida	30	32,22	23,21	26,24
81	Rhodotorula	30*	1,1	0,0	0,0
82	Aspergillus	40	37,44	88,74	88,74
83	Candida	40	15,21	21,25	31,36
84	Rhodotorula	40	62,48	44,56	63,60
85	Aspergillus	50	34,38	46,98	46,103
86	Candida	50	30,27	26,36	36,36
87	Rhodotorula	50	17,22	36,13	36,18
88	Aspergillus	90	42,46	94,90	94,102
89	Candida	90	32,63	50,60	50,76
90	Rhodotorula	90*	Incontables (masa asalmonada)	Incontables (masa asalmonada)	Incontables (masa asalmonada)
Σ ambas placas hongos			1.341	1.826	2.003
Comparativa total (En rojo los resultados descartados como aberrantes)				136,17 % por encima del SDA en 5 días	149,37% más que el SDA en 5 días y 109,69% más que Rapid YM en 2 días

## 4. Estudio estadístico de los datos

La exactitud medida como recuperación relativa media en % respecto a cepas cuantitativas certificadas (como criterio estándar, ver ejemplos de fertilidad mínima para medios generales y selectivos en los anexos de la Norma ISO 11133-2: 50-95%) no nos interesa en esta validación. Lo que queremos comprobar es la exactitud (y además la rapidez) del medio Rapid YM Agar de Microkit con respecto al SDA estándar.

**Candida albicans con halos en 3 días**



## validación cuantitativa

### Exactitud absoluta entre el Rapid YM Agar 2 días a 35 °C y el SDA 5 días a 25 °C

Rango de medida	Recuento en Rapid YM Agar 2 días	Recuento en SDA 5 días	Recuento Rapid YM Agar /SDA
Bajo	404 colonias/60 placas	406 colonias/60 placas	99,51%
Medio	992 colonias/60 placas	915 colonias/60 placas	108,42%
Alto	1.826 colonias/60 placas	1.341 colonias/60 placas	136,17%
Exactitud absoluta media			114,7%

*Excelente, superior al 90% necesario según ISO 11133-2 e incluso >100% de excelencia en menos tiempo que el SDA (ahorra 3 días)*

### Exactitud absoluta entre el Rapid YM Agar 3 días a 35 °C y el SDA 5 días a 25 °C

Rango de medida	Recuento en Rapid YM Agar 3 días	Recuento en SDA 5 días	Recuento Rapid YM Agar /SDA
Bajo	435 colonias/60 placas	406 colonias/60 placas	104,14%
Medio	1.097 colonias/60 placas	915 colonias/60 placas	119,89%
Alto	2.003 colonias/60 placas	1.341 colonias/60 placas	149,37%
Exactitud absoluta media			124,47%

*Excelente, superior al 90% necesario según ISO 11133-2 e incluso >100% de excelencia en menos tiempo que el SDA (ahorra 2 días)*

### Otras conclusiones interesantes: El Rapid YM Agar obtiene resultados muy similares cuando se incubaba a 35°C en 2 y en 3 días (48 h y 72 h)

Rango de medida	Recuento en Rapid YM Agar 2 días	Recuento en Rapid YM Agar 3 días	Recuento 2/3 días
Bajo	404 colonias/60 placas	435 colonias/60 placas	92,87%
Medio	992 colonias/60 placas	1.097 colonias/60 placas	90,43%
Alto	1.826 colonias/60 placas	2.003 colonias/60 placas	91,16%
Exactitud absoluta media			91,49 % (>90%)

*De modo que podemos reducir el tiempo de incubación de Hongos, incluyendo los alterativos en verano y asociados al hombre, (saprófitos a 35°C), de 5 días a sólo*

La conclusión es clara: podemos trabajar con plena confianza con Rapid YM Agar y ahorrar 2 o incluso, si nos conviene (leer las placas de recuento de aerobios y de hongos el mismo día), 3 días de incubación. Por tanto, el recuento de hongos deja de ser uno de los dos hándicaps que nos obligaban hasta ahora a retener el producto final durante 5 días. Como ya resolvimos el otro hándicap, cuando validamos el PCA cromogénico para recuento total de aerobios en 48 horas (sean aerobios asociados al hombre o alterativos en verano, a 35 °C, sean aerobios alterativos en las temperaturas de almacenamiento de

primavera-otoño a 25 °C); la cuarentena de stock de producto terminado la pasan a marcar desde ahora los patógenos lentos (sobre todo *Staphylococcus aureus*, con sus 3-4 días entre enriquecimiento + aislamiento en placa).

Precisión: No era el motivo de esta validación centrarnos en este parámetro, que en este caso mide sobre todo el trabajo repetitivo del analista en los duplicados de placas, pero aun así estudiaremos los pares de cada placa. Los resultados de SDA a 5 días y de Rapid YM Agar a 2 días indican:

## validación cuantitativa

Rango bajo	SDA 5 días			Rapid YM Agar 2 días		
Muestra	Datos, Media	Sm	CV% Sm/Media	Datos, Media	Sm	CV% Sm/Media
Total	406	-	31,65%	404	-	24,92%

*En ambos casos los medidores de la precisión están dentro de los rangos más estrictos, sobre todo en el caso del Rapid YM Agar (por debajo de CV 25%)*

Rango medio	SDA 5 días			Rapid YM Agar 2 días		
Muestra	Datos, Media	Sm	CV% Sm/Media	Datos, Media	Sm	CV% Sm/Media
Total	915	-	19,11%	992	-	21,21%

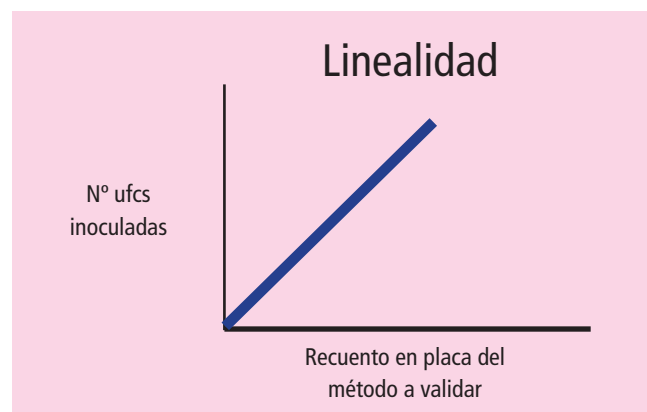
*En ambos casos los medidores de la precisión están dentro de los rangos más estrictos, por debajo de CV 25%. Como es habitual, el rango medio es el más preciso*

Rango alto	SDA 5 días			Rapid YM Agar 2 días		
Muestra	Datos, Media	Sm	CV% Sm/Media	Datos, Media	Sm	CV% Sm/Media
Total	1.341	-	22,29%	1,826	-	19,3%

*En ambos casos los medidores de la precisión están dentro de los rangos más estrictos, por debajo de CV 25%*

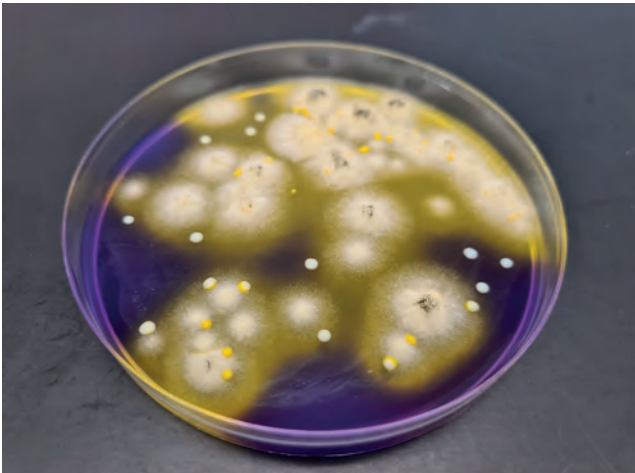
La precisión resulta bastante similar en ambos medios, ya que es una variable que depende más del analista que del medio.

La linealidad es el grado de concordancia entre lo esperable (ufc/inóculo) y lo detectado (colonias/placa) en los diferentes rangos de recuento en placa:



Rango de medida	Rtos. medios en SDA, 5 días y valor estimado medio	Rtos. medios en Rapid YM Agar, 2 días
Bajo: 5 ufc/inóculo	406/60 col/placa = 6,77	404/60 col/placa = 6,73
Medio: 14 ufc/inóculo	915/60 col/placa = 15,25	992/60 col/placa = 16,53
Alto: 37 ufc/inóculo	1.341 /60 col/placa = 22,35	1.826/60 col/placa = 30,43

## validación cuantitativa



### Mix de levaduras y mohos en 36 horas

La linealidad ha quedado demostrada en ambos medios porque las medias obtenidas de los recuentos en placa van subiendo conforme suben los valores inóculo, en cada uno de los rangos, de una forma muy evidente, aún mejor en Rapid YM Agar que en SDA.

La selectividad inclusiva (inclusividad) es la escasez de falsos negativos con diferentes dianas.

Hay unos escasos falsos negativos, 100% achacables al poder inhibitorio de dos matrices (ya que se repiten en ambos medios y en los tres rangos para un hongo concreto, en un caso *Aspergillus* –matrices 4 y 64- y en otro *Rhodotorula* –matrices 21, 51 y 81). En el rango más bajo que se puede incluir en una validación no hay falsos negativos, por lo que ambos medios funcionan muy bien al respecto. Incluso en valores normalmente indetectables a causa de la incertidumbre (como son solo 1 o 2 ufc/inóculo), de modo que en el total de 180 muestras (30 x 3 rangos x 2 medios) hay 6 con falso negativo de estos dos microorganismos entre ambos medios, mientras *Candida albicans* no ha sufrido ningún caso de falsos negativos. La inclusi-

vidad es pues del  $1-(6/180) \times 100 = 96,66\%$ , superior al típico 90% y al estricto 95%.

La especificidad exclusiva (exclusividad) es la escasez de falsos positivos con diferentes interferentes. Falsos positivos de bacterias ha habido 5 de 18. En el rango bajo, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* hicieron sinergia para combatir el cloranfenicol de las placas de ambos medios, lo que demuestra que, en la rutina del laboratorio, en cualquier medio con CAF, algunas colonias con aspecto de levadura podrían ser de bacterias. Al no haberlos mezclado con levaduras ni mohos, hemos podido detectarlos, pero ahora ya sabemos que algo así puede suceder. En las muestras naturales la exclusividad de ambos medios con cloranfenicol es muy probable que se acerque al 100%.

También se puede considerar un parámetro bastante robusto: no hay enormes diferencias en el recuento entre ambos medios. La diferencia entre ambos es el tiempo de incubación, muy inferior en el Rapid YM Agar (2 días) respecto al del SDA (5 días).

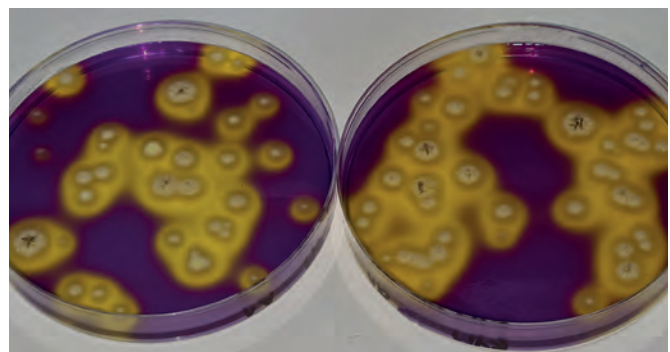
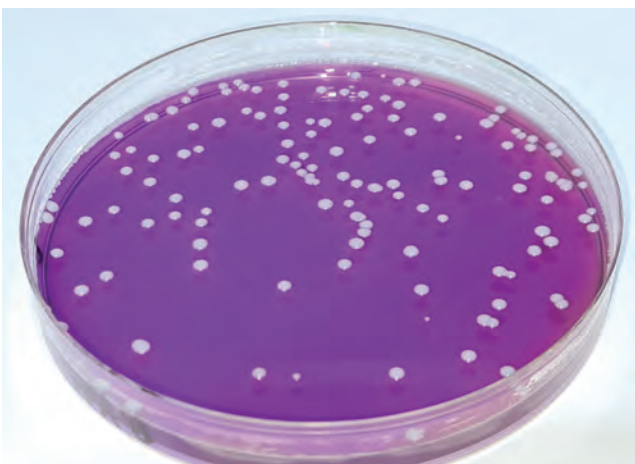
## 5. Conclusiones

Por todo ello, se considera validado el parámetro de recuento de hongos en nuestras muestras cosméticas, empleando Rapid YM Agar de Microkit frente al SDA, con mejores resultados: recuentos medios más elevados, más cercanos a la realidad; y recuentos fiables muchísimo más rápidos (2 días en vez de 5).

El objetivo de conveniencia de este laboratorio era validar este medio en 48 horas, pero sabemos que es todavía más rápido y detecta y enumera perfectamente desde las primeras 36 horas tanto las levaduras como los mohos (ver validación Rapid-YM en alimentos frente a SDA y a DRBC y fotografías de abajo).

[www.microkit.es](http://www.microkit.es)

(Véase anuncio en la sección Guía del Comprador.)



**Candida y Aspergillus en solo 36 horas en Rapid YM Agar de Microkit**