

Validación del nuevo método DryPlates®-XBC

Jorge Sanchis¹

¹ Laboratorios MICROKIT, S.L. Madrid, España, Microkit@microkit.es

INTRODUCCIÓN

El nuevo sistema validado tiene grandes ventajas sobre el método clásico, al tratarse de placas preparadas pero deshidratadas (1 año 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 agar del método tradicional para siembra en masa, así como mucha manipulación y tiempo de trabajo. Y 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 su soporte una fibra de malla muy fina, que permite obtener colonias con aspectos muy similares a los de las colonias crecidas en medios agarizados clásicos. Las DryPlates® minimizan la manipulación de la siembra en masa, permitiendo el paso de la muestra a la estufa, en sólo 10 segundos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Entre Septiembre y Octubre de 2013 se compara durante su diseño final un total de 99 muestras con cepas de referencia cuantitativas para el parámetro de detección y recuento de *Bacillus cereus*, siguiendo el método MICROKIT® mediante DryPlates®-XBC, con respecto al método oficial (Normas Técnicas oficiales vigentes para microbiología): Agar Mossel (PREP, MYP, ISO 7932, ISO 21871) y UNE 11133-2 sobre control de la fertilidad de los medios de cultivo cuantitativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuento en placa de *B.cereus* en DryPlates®-XBC de MICROKIT® respecto al método de referencia.

Estudiamos los parámetros estándar de validación cuantitativa con lectura de resultados a las 18h:

- Exactitud (recuperación relativa de un método respecto al otro)
- Precisión del método (repetitividad por triplicados + reproducibilidad mediante analistas y días diferentes)
- Rango de recuento (límites superior e inferior de cuantificación)

Tabla 1: Presentación de resultados comparativos.

CEPAS DE REFERENCIA EMPLEADAS:	DRYPLATE X-BC Media Nº colonias diana (azul con viraje del medio a fucsia)	placa 90mm Mossel Media Nº colonias diana (céreas con viraje del medio a fucsia)	% RECUPERACIÓN RELATIVA DryPlates®-XBC de MICROKIT® respecto al método de referencia
en todas las placas hay <i>B.cereus</i> y además un interferente o acompañante:			
<i>Aerococcus viridans</i>	55	34	162 %
<i>Aspergillus niger</i>	65	12	542 %
<i>Bacillus cereus</i> sin otras cepas	152	118	129 %
<i>Bacillus subtilis</i>	57	27	211 %
<i>Bacillus thuringiensis</i>	incont masas azules (sin viraje del medio a fucsia en 18h)	35	---
<i>Burkholderia cepacia</i>	58	13	446 %
<i>Candida albicans</i>	64	16	400 %
<i>Caulobacter vibroides</i>	48	26	185 %
<i>Citrobacter freundii</i>	52	15	347 %
<i>Clostridium perfringens</i>	48	18	267 %
<i>Clostridium sporogenes</i>	62	23	270 %
<i>Enterococcus faecalis</i>	81 y colonias verdes 24	20 y colonias no diana 10	405 %
<i>Escherichia coli</i>	60	17	353 %
<i>Klebsiella aerogenes</i>	78	12	650 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	62	12	517 %
<i>Listeria monocytogenes</i>	masa negruzca	masa distintos colores	---
<i>Listeria innocua</i>	65	20	325 %
<i>Listeria ivanovii</i>	62	17	365 %
<i>Listeria welshimeri</i>	masa negruzca	masa distintos colores	---
<i>Micrococcus luteus</i>	59	18	328 %
Mix Lactobacilos salvajes	65	13	500 %
<i>Proteus mirabilis</i>	34	23	148 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62	19	326 %
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	37	15	247 %
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	88	23	383 %
<i>Salmonella nottingham</i>	59	20	295 %
<i>Salmonella enterica typhimurium</i>	81	12	675 %
<i>Salmonella enteritidis</i>	68 y colonias amarillas 63	15	453 %
<i>Serratia marcescens</i>	73	17	429 %
<i>Shigella sonnei</i>	50	16	312 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	51	20 y colonias amarillas 180	255 %
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	46	12	383 %
<i>Yersinia enterocolitica</i>	47	13	362 %

Se ha comprendido el rango de recuento en placa entre 32 y 152 colonias/placa. En él, la **exactitud** de las DryPlates®-XBC con respecto al Agar de referencia es impresionante, superando en todos los casos el 100% de recuperación y obteniendo una media de $355,67 \pm 132,5$ % de recuento, lo cual se puede asegurar (no se trata de falsos positivos) al conocerse el valor inóculo de la cepa diana. Se concluye que el método DryPlates®-XBC es capaz de detectar hasta **3,5 veces más ufc de *Bacillus cereus*** que el método de referencia cuando hay cepas acompañantes y 1,3 veces más cuando se trata de cultivos puros.

Las réplicas realizadas tanto en triplicados de placas de ambos métodos como en repeticiones por parte de diferentes analistas y en diferentes días, no arrojan diferencias significativas entre ambos métodos, ya que la precisión depende más de otros factores que de los medios de cultivo: La **precisión es adecuada** tanto en repetibilidad como en reproducibilidad.

Los únicos **interferentes** que crecen en DryPlates®-XBC, pero siempre con colonias de colores diferentes a la diana (azul con halo fucsia en 18h) son:

-*Bacillus thuringiensis*: colonias azules PERO medio salmón cuando no está presente *B.cereus*; mezcla de colonias azules y medio fucsia cuando está presente *B.cereus*. En el medio de referencia no se distinguen los dos tipos de colonias.

-*Enterococcus faecalis*: PERO colonias verdes y medio salmón cuando no está presente *B.cereus*; mezcla de colonias verdes y azules y medio fucsia cuando está presente *B.cereus*. En el medio de referencia también aparecen colonias atípicas.

-*Listeria monocytogenes* y *L.welshimeri*: PERO colonias negras y medio salmón cuando no está presente *B.cereus*; mezcla de colonias negras y azules y medio fucsia cuando está presente *B.cereus*. En el medio de referencia también aparecen colonias atípicas con ambas especies.

-*Salmonella enteritidis*: PERO colonias amarillas y medio salmón cuando no está presente *B.cereus*; mezcla de colonias amarillas y azules y medio fucsia cuando está presente *B.cereus*. En el medio de referencia no aparecen colonias atípicas de este microorganismo, pero si de *Staphylococcus aureus*, con lo cual el número de interferentes es el mismo en ambos métodos; con la ventaja del método DryPlates®-XBC de distinguir perfectamente en todos los casos entre el microorganismo diana y el interferente, lo cual no ocurre en el método de referencia con *B.thuringiensis*, que implica falsos positivos.

De modo que no se puede hablar de interferentes que crean falsos positivos en el método DryPlates®-XBC, que demuestra así una **especificidad exclusiva**.

No ha aparecido falsos negativos, lo que demuestra una **sensibilidad inclusiva** para el método DryPlates®-XBC.

Hay que ser prudentes no obstante a la hora de valorar el comportamiento de las Dry-Plates® XBC de MICROKIT® en algunas matrices, por ejemplo muy espesas, grasas, insolubles en agua o muy salinas.

Por todo ello, quedan **VALIDADAS** las Dry-Plates® XBC para detección y recuento de *Bacillus cereus*, 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. Además, lo hacen como mínimo, tan bien como el método de referencia, demostrando una muy superior sensibilidad relativa, así como una mayor exactitud y economía que el método de referencia, en su implantación en los distintos laboratorios que los aplican. 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.

BIBLIOGRAFÍA

- UNE-EN ISO 7932: 1993, ISO 7932:2004 Microbiología. Guía general para el recuento de *Bacillus cereus*. Técnica de recuento de colonias a 30°C.
- UNE-EN-ISO 21871:2006 Microbiología de alimentos: Método horizontal para el recuento de números bajos de presuntos *B.cereus*
- ISO/TS 11133-2:2003 Microb.alim: Preparación y producción de medios de cultivo-Pruebas de rendimiento
- UNE-EN ISO 16140: Microbiología de los alimentos: Protocolo para la validación de métodos alternativos
- Sanchis, J. 2006 PRT-VAL-001 Protocolo MICROKIT para VALIDACIÓN en microbiología (69 páginas)
- Sanchis, J. 09/2008: PROTOCOLOS MICROKIT VALIDADOS PARA ANALISIS DE ALIMENTOS. Protocolos MICROKIT para control microbiológico de alimentos, VALIDADOS mediante 10 años de ensayos intercomparativos SEILALIMENTOS. XVI Congreso microbiología de alimentos. Córdoba, 9/2008.



DryPlates®XBC: en 6-18 horas, colonias azules y medio virado casi completamente del salmón al fucsia

