

5.5 PROCEDIMIENTO PARA EL USO E INTERPRETACIÓN DE PLACAS COMPACT DRY.

Introducción.

El recuento en placa permite determinar el número de microorganismos presentes en una muestra, en base a que se desarrollen en el medio de cultivo sólido, formando colonias. Por lo tanto, por este método se determinan sólo las células microbianas VIABLES en las condiciones que se trabaja (nutrientes, atmósfera y temperatura). Como las colonias pueden originarse tanto de una célula como de un grupo de células, se utiliza el término: UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC).

Materiales.

- Placas Compact Dry.
- Estufa de incubación.

PROCEDIMIENTO

Una vez que se tiene la muestra o la dilución deseada, al igual que la placa Compact Dry seleccionada, proseguimos a realizar los siguientes pasos:

1. Escribir sobre la parte inferior central de la placa la información para distinguirla. (por ejemplo: # de muestra, Lugar de recolección, etc...)



2. Abrir la placa Compact Dry depositar 1mL. de la muestra sobre la parte central del compact dry



3. Colocar nuevamente la cubierta sobre la placa, girándola para cerrar.



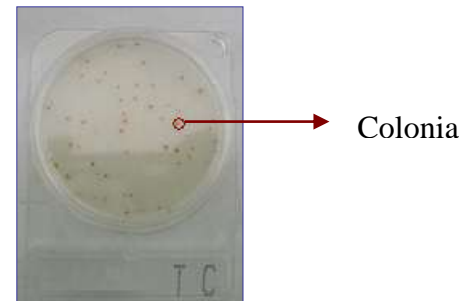
4. Siga las instrucciones de incubación interpretación para cada una de nuestras diferentes placas:

Compact Dry TC para cuenta total

Temperatura de incubación: 37 +/-2°C

Tiempo de incubación: 48 hrs.

Interpretación de resultados: Casi todas las colonias que crecen son de color rojo, junto con las de otros colores arrojan el recuento total.

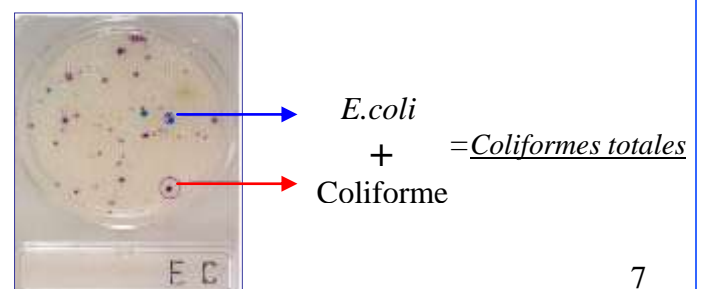


Compact Dry EC para *E. coli* y coliformes

Temperatura de incubación: 37 +/- 2 °C

Tiempo de incubación: 24 hrs.

Interpretación de resultados: Los coliformes se observan como colonias color rojo o magenta, mientras que las colonias de *E. coli*, se observan en color azul. **Sumando las colonias rojas y azules resulta la cifra total del grupo coliforme.**

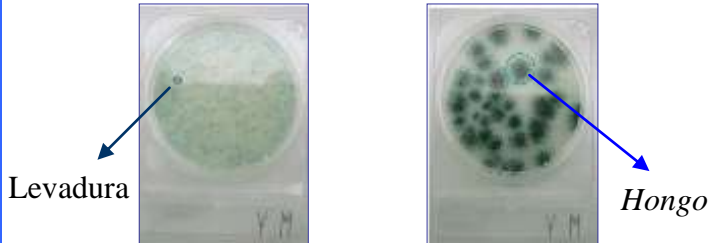


Compact Dry YM para levaduras y mohos

Temperatura de incubación: 25 a 30 °C

Tiempo de incubación: 3 a 7 días

Interpretación de resultados: levaduras en colonias puntuales azules, hongos desarrollados en forma radial de diferente pigmentación y tamaño.

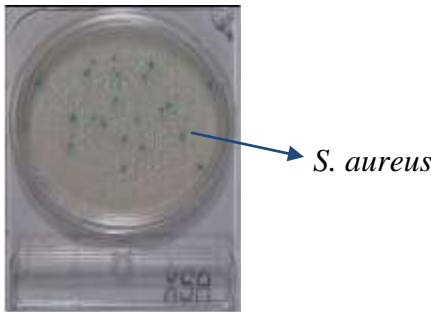


Compact Dry SA para *Staphylococcus aureus*

Temperatura de incubación: 37° +/- 2 °C

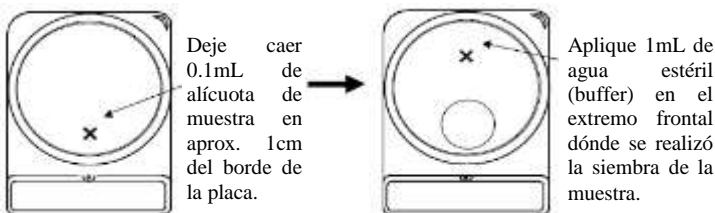
Tiempo de incubación: 24hrs

Interpretación de resultados: Las colonias características se observan verde azuladas



Compact Dry SL para *Salmonella*

Pre-incubación: Tomar alícuota de 25gr ó mL de muestra y llevar a 225mL de diluyente y homogenizar (ver procedimiento 5.4). Incubar la muestra de 20-24 horas a 37°C +/- 2 °C. Posterior al tiempo de **pre-incubación**, homogenice y tome 0.1mL de alícuota (3 gotas), siembre sobre una de las orillas del Compact dry SL (aprox. a 1 cm lejos del borde de la placa). La muestra se difunde automáticamente. Una vez realizada la siembra de la muestra, aplique de 0.9mL- 1mL máximo de diluyente estéril (buffer) en el extremo opuesto de la placa; esté se difunde automáticamente sobre el resto de la superficie de la placa, ver figuras siguientes:



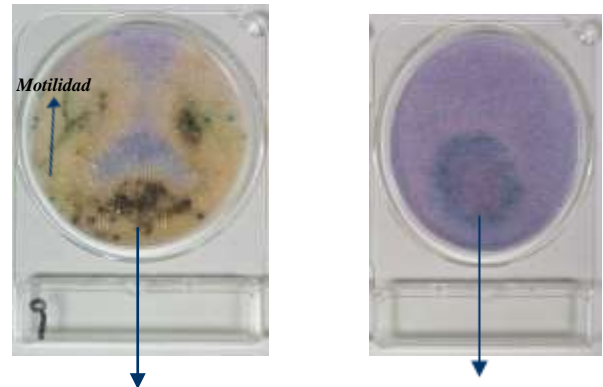
Nota: Evite la siembra al borde de la placa ya que la alícuota de la muestra es pequeña y puede ser absorbida hacia la periferia; y no sobre la superficie de la placa SL.

Tape herméticamente para evitar la pérdida de humedad y gire la placa (tapa abajo) para incubar.

Temperatura de incubación: 41° +/- 2 °C

Tiempo de incubación: 20-24hrs.

Interpretación de resultados: colonias verde claro a verde malaquita (negruzcas), cambio de medio de morado a amarillo (alcalinización del medio) y motilidad de crecimiento.



Salmonella positivo

Motilidad, siembra inicial en orilla inferior y posterior extensión del crecimiento al resto de la placa con vire del medio a amarillo. Presencia de colonias verde a verde oscuras.

Salmonella negativo

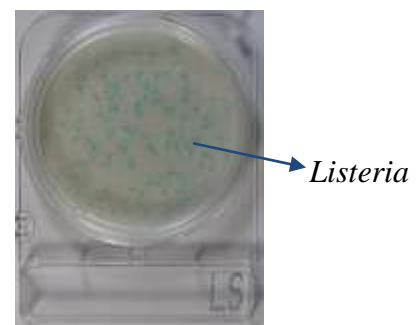
Nota importante: La presencia de otras bacterias del grupo coliforme como *E. coli* genera el cambio de color de azul-púrpura a rojo-púrpura por fermentación de lactosa y/o sacarosa en el medio; esté vire en el medio NO deberá considerarse para *Salmonella*.

Compact Dry LS para *Listeria*

Temperatura de incubación: 37° +/- 2 °C

Tiempo de incubación: 24hrs

Interpretación de resultados: Las colonias características se observan en color azul y azul-claro.



Expresión de resultados, criterios generales.

Para el caso de bacterias, contar el número de colonias desarrolladas en la placa, si el número de colonias se encuentra entre 25 y 250 colonias, multiplicar la cantidad de colonias por el inverso de la dilución (10, 100, 1000), y expresar el resultado como UFC/g ó mL.

En el caso de Hongos y levaduras, si el número de colonias se encuentra entre 10 a 150 colonias, multiplicar el número de colonias por el inverso de la dilución (10, 100, 1000) y expresar el resultado como UFC/g ó mL.

Cuando esto no se cumple se considera el resultado obtenido como “VALOR ESTIMADO” del recuento.

Para el caso de *Salmonella* se reporta como crecimiento positivo ó negativo, se sugiere en caso de presentar crecimiento positivo, confirmar por medio de ensayos bioquímicos ó pruebas API.

CONFIABILIDAD DE MINILAB ESTUDIO DE VALIDACION INDEPENDIENTE DE LAS PLACAS COMPACT DRY

(JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL Vol. 88, No.6,2005)
El estudio de validación fue conducido por el Servicio de Salud Publica Nacional, bajo la responsabilidad de Richard Meldrum y la dirección de AOAC RI.

El método oficial de referencia realizado fue el de la AOAC 966.23, exactamente según lo especificado sin desviaciones ni alteraciones.

Preparación y análisis de las muestras:
A cada muestra se le asigno un código de identificación, las muestra fueron examinadas por duplicado usando el procedimiento de Compact Dry, y el Método Oficial AOAC 966.23, respectivamente.

Las placas fueron incubadas a 35°C por 48 hrs., posteriormente fueron contadas las placas que contenían entre 30 y 300 UFC.

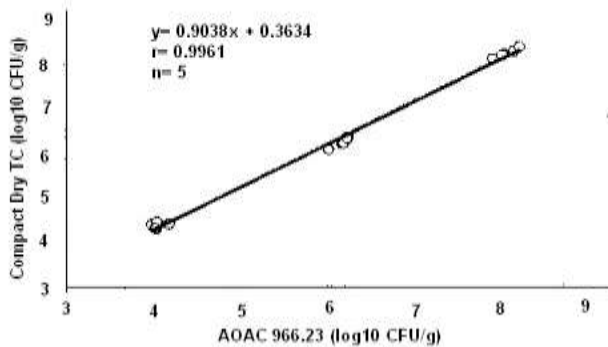
Resultados

En la siguiente tabla se compara el análisis por Compact Dry TC y el método Oficial 966.23, los cuales presentan un rango decimal parecido. La evaluación en la desviación estándar es similar en las muestras para ambos métodos. Se realizaron 5 réplicas de cada análisis.

Tabla Comparativa Compact Dry TC contra Método AOAC 966.23 en UFC/g

Lote	Replicas	CFU/g	Log 10 CFU/g	CFU/g	Log 10 CFU/g
1 (104UFC/g)	5				
	Promedio	11500	4.06	23780	4.37
	ST	2200	0.08	3280	0.06
	RSDr%	19.1	1.89	13.8	1.38
2 (106UFC/g)	5				
	Promedio	1616000	6.20	1415000	6.14
	ST	307000	0.09	321000	0.10
	RSDr%	19.0	1.49	22.7	1.68
3 (108UFC/g)	5				
	Promedio	138400000	0.12	27250000	0.10
	ST	384000000	0.12	27250000	0.10
	RSDr%	27.7	1.50	23.2	1.22

La Desviación Estándar en los 3 diferentes lotes es similar en ambos métodos. La correlación del coeficiente en ambos métodos es de 0.9961.



Discusiones:

De acuerdo a los resultados, la gran ventaja del sistema Compact Dry, es que reduce las horas - hombre, y es un método económico. En términos de preparación de la placa, inoculación y lectura de resultados, el sistema Compact Dry fue más rápido que la técnica convencional de vaciado en placa.

La lectura de las placas con el sistema Compact Dry fue más rápida debido a su indicador TTC, (Cloruro de tetrazol) ya que el indicador no es absorbido por las partículas que contenga la muestra y por lo tanto permite la identificación rápida de las colonias.

Conclusiones:

Los resultados obtenidos en este estudio en la comparación del método Compact Dry, vs. el Método Tradicional de vaciado en placa, para la estimación de la cuenta total de microorganismos aerobios, muestra que los dos métodos son igualmente buenos. Por lo tanto las placas Compact Dry El Sistema Compact Dry (elemento fundamental en sistema Minilab) puede ser una alternativa para realizar un análisis microbiológico de rutina.

Para el caso de México

La Secretaria de Salud, a través de COFEPRIS extiende un oficio con número CAS/DEACIP/07330060063377/2007, donde exonera al Comapact Dry de registro o permiso sanitario para el uso y aplicación en la Industria cosmética, alimenticia y de bebidas.