

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

Alumna: Paola C. Lorenzo – Bioquímica

Especialidad: Calidad Industrial de los Alimentos

Cohorte: 2016-2017

“Elección de una metodología para la estimación de la incertidumbre asociada a ensayos cuantitativos de un laboratorio de microbiología de alimentos”

INDICE

1. Introducción.....	4
2. Objetivo.....	4
3. Alcance.....	5
4. Abreviaturas y definiciones.....	5
5. Laboratorio de Microbiología Agrícola (LMA) de Senasa	7
6. ¿Para qué estimar incertidumbre de medición en el LMA?	9
7. Incertidumbre en análisis microbiológicos de alimentos.....	12
8. Metodología de evaluación de la incertidumbre en microbiología de alimentos	14
8.1 Definición del mensurando.....	14
8.2 Identificación de las fuentes de incertidumbre en un laboratorio de microbiología de alimentos	15
8.2.1 Muestreo	15
8.2.2 Muestra y/o matriz alimenticia	15
8.2.3 Materiales de referencia	15
8.2.4 Efectos instrumentales y de equipamiento	16
8.2.5 Efectos volumétricos.....	16
8.2.6 Efectos gravimétricos.....	16
8.2.7 Calidad de los medios de cultivo y reactivos	17
8.2.8 Condiciones de almacenamiento.....	17
8.2.9 Condiciones de incubación	18
8.2.10 Efectos de esterilización.....	18
8.2.11 Lectura, interpretación y comunicación de los resultados.....	18
8.2.12 Condiciones de instalaciones y ambientales.....	19
8.2.13 Otros.....	19
8.3 Estimación de la incertidumbre de medida.....	19

8.4 Expresión del resultado	23
9. Consideraciones de la norma ISO/TS 19036:2006 para el protocolo experimental	24
9.1 Fuentes de incertidumbre críticas	24
9.2 Microorganismos (o grupos)	25
9.3 Métodos.....	25
9.4 Matrices y muestras.....	25
9.5 Grado y tipo de contaminación	25
9.6 Protocolo experimental propuesto	26
9.7 Recuentos esperados	27
9.8 Transformación de los datos a logaritmo	27
9.9 Estimación de la incertidumbre combinada	27
9.10 Cálculo de la incertidumbre expandida	28
9.11 Expresión del resultado	28
10. Protocolo experimental propuesto para el LMA.....	29
11. Conclusiones.....	35
12. Referencias	36

1. Introducción

La Norma IRAM 301 ISO/IEC 17025:2005 establecía que los laboratorios de ensayo debían poseer y aplicar procedimientos para la estimación de la incertidumbre de medición asociada a sus resultados, en todos los casos que fuese aplicable, cuando lo solicitase un cliente o cuando ésta afectase el cumplimiento de especificaciones.

Sin embargo, la versión actual de la norma IRAM 301 ISO/IEC 17025:2017, indica que los laboratorios deben identificar las contribuciones a la incertidumbre teniendo en cuenta todas las que sean significativas. Además los mismos deben evaluar la incertidumbre de medición (o estimarla cuando el método de ensayo no permita una evaluación rigurosa).

El campo de la microbiología de alimentos no está exento de dicha estimación y dado que muchas decisiones se toman en base a resultados cuantitativos, es necesario para los laboratorios especializados, contar con este parámetro como un indicador de la calidad de las mediciones realizadas en los mismos y que además sirva para evaluar la confiabilidad de los resultados que el laboratorio emite.

Conocer la incertidumbre asociada a una medición es una fuente valiosa de información para los microbiólogos como parte del control de calidad interno de los resultados obtenidos ya que aporta datos de variabilidades que se asocian a diversos factores (técnicas, instrumentos, equipamiento, analistas, ambientales, etc.).

Si la misma es lo suficientemente grande, puede afectar con los cumplimientos de límites impuestos por normativas o reglamentaciones (nacionales o internacionales) para cada alimento en particular, poniendo en riesgo, en definitiva, la inocuidad y seguridad alimentaria.

Un resultado informado, junto con la incertidumbre de medición asociada, ayuda a la toma de correctas decisiones comerciales o de aspectos relativos a la calidad que puedan afectar a la producción, comercialización y salud de la población.

2. Objetivo

El presente trabajo tiene como objetivo:

- Detallar las fuentes de incertidumbre que afectan a los ensayos microbiológicos en general.
- Describir métodos de evaluación de incertidumbre.
- Proponer un método práctico, sistemático y confiable para la estimación de la incertidumbre de medición de ensayos microbiológicos cuantitativos basados en el recuento de colonias que se realizan en el Laboratorio de Microbiología Agrícola (LMA) de Senasa de acuerdo en la norma ISO/TS 19036:2006.
- Desarrollar un protocolo experimental para la aplicación de la metodología (con un ejemplo de aplicación).
- Indicar lineamientos para la expresión del resultado final.
- Implementar la metodología para cualquier microorganismo (o grupo) y/o método a ensayar según los requisitos de la norma IRAM 301 ISO/IEC 17025.

Con ello, el laboratorio será capaz de informar la incertidumbre junto con los resultados de los ensayos, aportando mayor información a clientes en caso de solicitarlo y se utilizará como una medida cuantitativa de la calidad de los resultados microbiológicos.

3. Alcance

El siguiente trabajo se aplica a ensayos microbiológicos cuantitativos de alimentos que se realizan en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de Senasa, destinados al consumo humano y alimentación animal donde la enumeración de microorganismos se lleva a cabo mediante técnicas tradicionales de recuento de colonias en placa de Petri. Tiene aplicación a cualquier resultado incluyendo recuentos de bajo número de microorganismos.

Se excluyen a los métodos de enumeración de microorganismos utilizando la técnica del número más probable (NMP) u otros métodos de detección cualitativos.

4. Abreviaturas y definiciones

Abreviaturas:

CAA: Código Alimentario Argentino

ICMSF: International Commission on Microbiological Specification for Food

IRAM: Instituto Argentino de Normalización

ISO: International Standardization Organization

LMA: Laboratorio de Microbiología Agrícola

OAA: Organismo Argentino de Acreditación

Definiciones:

Analito: componente medido por el método de análisis. En el caso de métodos microbiológicos se refiere al microorganismo o productos asociados (enzimas o toxinas).

Factor de cobertura (k): factor numérico utilizado como multiplicador de la incertidumbre para obtener una incertidumbre expandida.

Incertidumbre de medición: Parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pueden ser razonablemente atribuidos al mensurando. El parámetro podría caracterizarse por cualquier medida de variabilidad, como ser una desviación estándar o un múltiplo de ella, o la mitad del intervalo con un cierto nivel de confianza.

Incertidumbre estándar $u(x_i)$: Incertidumbre del resultado x_i de la medición expresada como la desviación estándar.

Incertidumbre combinada $u_c(y)$: incertidumbre estándar del resultado de una medición cuando el mismo es obtenido de los valores de otras cantidades, igual a la raíz cuadrada positiva de la suma de los términos, siendo éstos las varianzas o covarianzas de estas otras cantidades y divididas por los resultados de esas mediciones.

Incertidumbre expandida (U): magnitud que define un intervalo en torno al resultado de una medición en el que puede esperarse que incluya una fracción importante de la distribución de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando.

Mensurando: Magnitud particular sujeta a medida.

En microbiología de alimentos es definido en términos del método empleado. Puede expresarse generalmente como unidades formadoras de colonias (ufc) o el Número más Probable (NMP) en la porción de muestra que se somete a cuantificación (g ó ml).

Precisión de medida: proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto (o similares) bajo condiciones especificadas

(repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad). Suele expresarse numéricamente como la desviación típica, la varianza o el coeficiente de variación.

Precisión intermedia: precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de precisión intermedia. Incluye el mismo procedimiento de medición, el mismo lugar y mediciones repetidas del mismo objeto durante un amplio periodo de tiempo, pero que pueden incluir otras condiciones que involucren variaciones (nuevas calibraciones, patrones, operadores y sistemas de medida).

Repetibilidad: precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad (el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación, el mismo lugar y mediciones repetidas del mismo objeto (o similar) en un periodo de corto tiempo).

Reproducibilidad: precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad (diferentes lugares, operadores, sistemas de medidas (pueden utilizar diferentes procedimientos) y mediciones repetidas de los mismos objetos (o similares)).

5. Laboratorio de Microbiología Agrícola (LMA) de Senasa

El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa) es encargado de la ejecución de las políticas nacionales que hacen referencia a la sanidad y calidad animal y vegetal, por otro lado, se ocupa de la inocuidad de los alimentos verificando el cumplimiento de las normativas vigentes en la materia. Además, el organismo controla el tráfico federal, las importaciones y exportaciones de los productos, subproductos y derivados de origen animal y vegetal, productos agroalimentarios, y demás relacionados con la agroindustria.

El rol del LMA en el organismo es la de realizar los controles microbiológicos necesarios a productos, subproductos, alimentos (para consumo humano y animal) y materias primas de origen vegetal con el objetivo de supervisar el cumplimiento de las reglamentaciones higiénico-sanitarias y bromatológicas alimentarias vigentes y certificar la aptitud comercial, industrial y sanitaria de los mismos, dando garantía a los países compradores de bienes nacionales de origen agrícola y a los ítems de comercialización dentro del territorio nacional.

Las muestras recibidas en el laboratorio, corresponden a alimentos que pueden estar mínimamente procesados o definitivamente no estarlos, que tienen como fin la evaluación de su aptitud para la exportación (las que deben cumplir con reglamentaciones del país receptor) como así también alimentos de producción nacional o importados, los cuales están destinados al consumo humano o animal, o como materia prima para la producción local.

Muchas solicitudes de ensayo corresponden a certificaciones de que la muestra a evaluar es “Apta para el consumo humano”, y de esta manera los recuentos microbianos deben cumplir con las exigencias del Código Alimentario Argentino (CAA).

Además el LMA participa, junto con otras áreas del organismo, en el “Plan Nacional de Control de Residuos, Contaminantes e Higiene de Alimentos de Origen Vegetal” (CREHA), mediante el cual realiza el monitoreo de agricultores con muestreos periódicos con el fin de minimizar los riesgos de contaminación. Este plan además contribuye a garantizar el afianzamiento de la sanidad e inocuidad de frutas y hortalizas frescas destinadas al mercado interno o de exportación y lograr protección a los consumidores, como también concientizar a los productores sobre la importancia de implementar buenas prácticas agrícolas. Los resultados de muestreos no conformes emitidos por el LMA, son comunicados al área correspondiente y se activa un sistema de alerta y seguimiento para la aplicación de las correspondientes acciones correctivas y el afianzamiento de acciones preventivas hacia los productores afectados.

Las matrices con las que trabaja el laboratorio son diversas: desde granos y sus subproductos, alimentos balanceados para consumo animal, frutas y hortalizas frescas, hasta, especias, frutas secas, etc. El laboratorio recibe muestras provenientes de un muestreo generalmente a granel que son realizados por inspectores del organismo siguiendo un procedimiento normalizado.

Dentro de los ensayos que realiza el LMA, el presente trabajo se enfocará en los de tipo cuantitativo con posibilidad de aplicarse tanto a bacterias indicadoras como patógenas.

El LMA trabaja bajo un sistema de calidad aplicando la norma ISO 17025 con métodos normalizados apropiados para el alcance, y los ensayos microbiológicos cuantitativos en su mayoría corresponden a la técnica de Recuento de colonias (ufc) en placas de Petri.

6. ¿Para qué estimar incertidumbre de medición en el LMA?

Una de las situaciones más habituales con que suele enfrentarse el microbiólogo es la dispersión de los resultados obtenidos en ensayos cuantitativos y ésta es una situación frecuente en el LMA.

A pesar de trabajar con métodos normalizados verificados y poder garantizar que los factores críticos de influencia se encuentran bajo control, existe una variabilidad que afecta al resultado de los ensayos.

Todo resultado cuantitativo se acompaña de una incertidumbre de la medición ya que existe variabilidad de las fuentes que participan en todo el proceso de medida, y esto ocurre especialmente en microbiología. De aquí surge la necesidad de cuantificar su aporte al resultado final. La estimación de la incertidumbre asociada a un resultado cuantitativo provee una forma de estandarización de la expresión de variabilidad ligada a un procedimiento analítico y brinda información sobre la dispersión de los valores que podrían ser atribuidos al mensurando.

Cuando se informa un resultado cuantitativo producto de un recuento bacteriano, el mismo es una mera aproximación al valor verdadero del mensurando: la incertidumbre completa el resultado de una medida y lo transforma en un intervalo de valores dentro del cual se encuentra el valor verdadero de esa cantidad medida (en nuestro caso microorganismos por unidad de muestra analizada).

El CAA establece criterios y patrones aplicables a la microbiología de alimentos que se basan en problemas de salud pública que tienen como finalidad uniformizar los mismos para el comercio entre los países del Mercosur y se toman como referencia documentos del CODEX ALIMENTARIUS y de la ICMSF. El CODEX ALIMENTARIUS elabora documentación referida a Buenas Prácticas de Manufactura y sus formas de evaluación, como Análisis de

Riesgo y Control de Puntos Críticos. De allí surgen los valores límites microbiológicos documentados.

El criterio microbiológico define que un alimento (y/o lote) sea aceptado de acuerdo a un número de microorganismos por unidad de masa o volumen bien definidos.

A su vez, el CAA define como “Criterios obligatorios”, a aquellos microorganismos considerados patógenos y/o sus marcadores que son de interés en salud pública (según la clase de alimento, proceso, franja etaria de consumo, etc.). También existen “Criterios complementarios” que son recomendatorios, y que pueden servir al productor y comerciante para evaluar la materia prima o el proceso tecnológico.

Pero, lamentablemente, en la actualidad, el CAA marca límites microbiológicos sólo para algunos pocos alimentos de origen vegetal, como son los vegetales refrigerados y congelados, frutas secas y harina de trigo. Existe escasa bibliografía de tolerancias para alimentos vegetales no procesados, lo que obliga a tomar como referencia datos evaluados por ICMSF y otros organismos internacionales.

Muchas veces se define un criterio microbiológico que debe cumplirse entre dos valores (especificación) como lo indica la Fig. 1. Como ejemplo, el art. 661 bis del Capítulo IX (actualizado al 02/2018) del CAA “Alimentos farináceos, cereales, harinas y derivados”, hace referencia a la matriz harina de trigo que debe responder microbiológicamente con el siguiente criterio de aceptación para el Recuento de aerobios mesófilos ((ufc/g) con un plan de muestreo de tres clases:

n	c	m	M
5	2	10^5	10^6

El caso C de la Fig. 1 representa la situación ideal de este ejemplo, donde se busca que los resultados analizados (incluyendo su incertidumbre), nunca superen el valor límite máximo impuesto (hasta dos unidades de muestra deben estar comprendidas entre m y M para aceptar la muestra)

No conocer la incertidumbre hace que tal vez se acepte un lote donde, como máximo, dos de las unidades presenten un resultado entre m y M (caso A de la Fig. 1). Pero el inconveniente surge cuando un laboratorio ha estimado la incertidumbre y la misma es lo suficientemente grande como para rechazar un lote, es decir, que el resultado final supere el valor máximo impuesto (M).

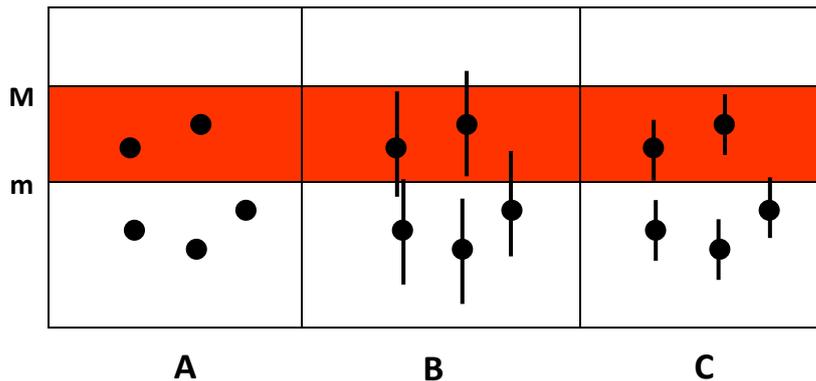


Figura 1
Incertidumbre de medición y cumplimiento de especificaciones para un Plan de tres clases

Nota: la banda roja representa un rango de valores definidos según diferentes especificaciones.

En el caso de vegetales deshidratados existe escasa bibliografía. El ICMSF hace referencia a algunas especias, donde se especifica la probabilidad porcentual de hallar recuentos de algunos microorganismos en un rango entre 10^2 a 10^8 ufc/g. En este caso no se indica tolerancia concreta o límite microbiológico ya que las diferencias se deben a la variedad de especies, clima o cuestiones estacionales. Sólo queda con esta información definir un valor límite de tolerancia recomendado según datos bibliográficos.

Por lo tanto, estimar la incertidumbre de las mediciones microbiológicas tiene ventajas ya que permite obtener un resultado final más confiable y con ello una mejor interpretación. Además ayuda a la toma de decisiones respecto a la validez de las metodologías de análisis y la evaluación de las variabilidades que están afectando la medición con el objetivo de detectar los factores críticos de influencia, minimizarlos y controlarlos. Es una medida que indica con qué nivel de confianza el laboratorio emite sus resultados analíticos.

7. Incertidumbre en análisis microbiológicos de alimentos

En microbiología de alimentos existen decenas de factores con influencia en el resultado final de medición. Se plantea la necesidad de identificar y analizar el grado de impacto de cada uno, de manera que aquellos que sean críticos, demuestren que se mantienen bajo control. El aporte de la estimación del parámetro incertidumbre al resultado final, será un reflejo de la magnitud de dicha variabilidad y dispersión de los datos obtenidos.

Como es sabido, las bacterias se comportan de forma completamente diferente de un analito químico o una medición física y es ésta una dificultad para un cálculo riguroso.

Es necesario comprender cómo los microorganismos interactúan en la naturaleza y las variables propias que aportan los métodos de ensayo, que son determinantes a la hora de obtener el resultado final de un recuento celular en una muestra, para elaborar conclusiones y decidir cambios en beneficio de resultados cuantitativos de mayor calidad.

Los ensayos microbiológicos informan el tipo de microorganismo presente en la muestra junto con una magnitud (ufc) por unidad de peso o volumen y son afectados por fuentes de variabilidad diversas, tal que las incertidumbres podrían estar sujetas a instrumentos, métodos, operadores, etc.

Todo alimento almacenado (incluso bajo condiciones óptimas de tiempo y temperatura), experimenta cambios gradualmente, no solo en referencia a su composición sino también al número de microorganismos presentes.

Debido a que el crecimiento de los microorganismos es función de características propias del género y/o especie, como también del ambiente en el que se desarrolla, existe una competencia entre la flora acompañante en función de diversos factores (temperaturas, composición bioquímica del alimento, consumo de nutrientes esenciales y efectos de antibiosis, entre otros) que en definitiva modifican las proporciones relativas de algunas bacterias por sobre otras en la muestra a lo largo del tiempo de almacenamiento.

También, existen varios tipos de distribución espacial de los microorganismos en la matriz alimentaria (uniforme, al azar, agregada). Pero en la naturaleza nada es absoluto, y es posible que exista más de un tipo de distribución presente al mismo tiempo en una muestra, considerándose que los microorganismos se disponen heterogéneamente en los alimentos.

Por ejemplo, la distribución de las bacterias en medios líquidos se podría describir usando el modelo de Poisson, pero no todas las fuentes de incertidumbre asociadas a un método e incluso, no todos los microorganismos en otros tipos de alimentos, siguen este mismo modelo.

Además se suman otras fuentes de variabilidad que ocasionan una clara dispersión de los resultados de acuerdo al método elegido para el ensayo. Cada método posee diferencias respecto de equipamiento necesario, medios de cultivo, temperaturas o condiciones de incubación. Las diferencias serán cada vez menores cuando se apliquen los mismos procedimientos de medida, es decir, cuando se trabaje con métodos normalizados y todo lo necesario que acompañe al ensayo se encuentre bajo control (calibraciones de equipos, lotes de reactivos, personal calificado, etc.).

Por lo tanto, existe un sinnúmero de factores que son fuente de variabilidad de los procesos e incluso hay contribuciones aleatorias propias del mensurando o del método elegido que son imposibles de cuantificar y minimizar y que tienen efecto sobre el resultado final.

Como se mencionó anteriormente, una manera de conocer en qué medida todos influyen sobre el resultado, es realizando una estimación de la incertidumbre de medición de cada método de ensayo.

Pero, la estimación de la incertidumbre en microbiología de alimentos dista de las metodologías que se utilizan en otras áreas debido a las características antes expuestas. Los factores con mayor peso a la hora de estimar la incertidumbre son, sin duda, la distribución no homogénea de los microorganismos en la muestra y el muestreo.

No debemos dejar de mencionar que si bien aquí hablamos de la importancia de la estimación de la incertidumbre de medición en métodos cuantitativos, debemos comprender que lo mismo afecta a métodos cualitativos.

Con todo, se concluye que dadas las características propias de los ensayos microbiológicos, es dificultoso construir un modelo apropiado que permita cuantificar las contribuciones de cada paso del proceso de medida, pero como lo indica la norma ISO 17025:2017, el laboratorio debería identificar los componentes de incertidumbre y demostrar que los mismos se encuentran bajo control para minimizar sus efectos. La estimación de la

incertidumbre para microbiología de alimentos no es metrológicamente rigurosa y por ello el consenso actual sobre la estimación de la incertidumbre en los ensayos microbiológicos cuantitativos es que la precisión es el componente más importante y el único que puede determinarse de manera práctica mediante la utilización de métodos experimentales (OAA).

8. Metodología de evaluación de la incertidumbre en microbiología de alimentos

El proceso de estimación de la incertidumbre en los ensayos microbiológicos deberían incluir las siguientes etapas:

8.1 Definición del mensurando

Muchas veces en microbiología de los alimentos el mensurando no se define correctamente o se utilizan métodos de ensayo inexactos para el fin propuesto (por ejemplo, detectar un microorganismo de forma presuntiva con un método que cuantifica, en realidad, un grupo de bacterias a la que éste pertenece).

Es sabido que los resultados de ensayos microbiológicos cuantitativos empíricos son dependientes del método específico elegido, pudiendo arrojar diferentes valores del parámetro medido y, de aquí, la necesidad de decidir y conocer desde el comienzo el método adecuado para el propósito y el procedimiento a aplicar para establecer de manera clara y sin ambivalencia el mensurando.

En general, luego de una serie de pasos (diluciones, siembras, incubaciones, etc.), el mensurando en los ensayos cuantitativos tradicionales de recuento en placa, es el producto de un cálculo final obtenido a partir de una submuestra. Por lo tanto, en esta etapa se debe hacer una declaración sobre qué es exactamente lo que se va a medir y la relación que existe entre el mensurando y las variables de entrada (por ejemplo, magnitudes medidas como volúmenes o pesada de muestras, factores de corrección, etc. que se describen en la ecuación matemática).

8.2 Identificación de las fuentes de incertidumbre

Su identificación no es una tarea sencilla pero es un paso clave en la evaluación de la incertidumbre y requiere esfuerzo y tiempo. No todos los componentes de incertidumbre poseen la misma contribución a la incertidumbre global y, por eso, se requiere que se analicen todas las fuentes, o las de mayor significancia, para poder hacer una estimación razonable y verificar bajo alguna metodología que las mismas se encuentran bajo control.

El objetivo de esta etapa es construir una lista conteniendo todas las fuentes de incertidumbre (o las de mayor contribución) que se puedan identificar de un método. Una forma sencilla y muy práctica es presentarlo con el Diagrama de Causa y Efecto o Ishikawa, que tiene la ventaja de mostrar sus interrelaciones.

Una herramienta útil es la realización previa de un diagrama de flujo del proceso de medición para identificarlas con mayor facilidad.

8.2.1 Muestreo

Se define como las unidades de muestra a analizar de un lote. El mismo se realiza de acuerdo a la norma específica del producto a estudiar. Si bien no es parte de la incertidumbre ligada a la medición en sí, es uno de los principales componentes de variabilidad.

8.2.2 Muestra y/o matriz alimenticia

El aporte a la incertidumbre por parte de la matriz, se debe a varios factores. Como se comentó anteriormente, los microorganismos no se distribuyen uniformemente en la muestra (existen diferencias de distribución espacial de los mismos según la matriz), lo que es una gran fuente de variabilidad. Además las bacterias poseen una variada estabilidad y/o estado fisiológico según la matriz a causa de interacciones en la misma (estrés) lo que afecta la recuperación de los microorganismos.

8.2.3 Materiales de referencia

La utilización de cepas de referencia certificadas con trazabilidad demostrable se realiza con fines de aseguramiento de la calidad, en la verificación o validación de métodos cuantitativos y como control de calidad. Si las mismas se mantienen y manipulan

correctamente, se reducen al mínimo las posibilidades de contaminación cruzada, mutación o alteración de las características fenotípicas características. Pero a diferencia de métodos químicos donde se utilizan materiales de referencia (y tal vez el resultado surge de una recta de calibración), no tienen aporte a la variabilidad de un método cuantitativo tradicional de recuento en placa, ya que no se utilizan para el cálculo final.

8.2.4 Efectos instrumentales y de equipamientos

En los laboratorios de microbiología de alimentos, los instrumentos y/o equipamiento más comúnmente usados son los volumétricos (pipetas), gravimétricos (balanzas) y térmicos (estufas de cultivo, estufas de esterilización, termómetros, registradores continuos de temperatura (data loggers) y autoclaves).

Es clave la planificación de las tareas de mantenimiento, calibración, reparación y verificación de los mismos. El uso, bajo incumplimiento de estos requisitos, exige una justificación razonable y verificable para garantizar que los efectos instrumentales no tengan influencia sobre los resultados esperados. Todas las calibraciones de dichos instrumentos y/o equipamientos están afectadas por una incertidumbre de medida.

8.2.5 Efectos volumétricos

La mayoría de los ensayos microbiológicos comienzan con la preparación de una suspensión inicial de la muestra a ensayar y diluciones seriadas de la misma. A pesar de la posibilidad de cometer el operador errores en este proceso, siempre existirá una variabilidad asociada a los volúmenes dispensados, propios de la incertidumbre de los materiales utilizados (pipetas graduadas de vidrio y/o micropipetas). La forma de minimizar estos efectos es trabajar con materiales volumétricos calibrados y verificados periódicamente.

8.2.6 Efectos gravimétricos

Paralelamente a lo que ocurre con lo descrito en 8.2.5 también aportan a la incertidumbre, el pesaje de medios de cultivo (medios de enriquecimiento líquido y/o ágaros o medios selectivos) como así de las muestras para la preparación de la suspensión inicial. Una forma de mantener bajo control este efecto es la utilización de balanzas calibradas y la realización de verificaciones periódicas de las mismas.

8.2.7 Calidad de los medios de cultivo y reactivos

Una práctica ordinaria es la utilización de medios de cultivo comerciales listos para su uso o deshidratados, como así también la preparación de medios a partir de componentes individuales e incluso la suplementación con soluciones (antibióticas, inhibidoras de flora acompañante y/o equilibradoras de pH). Muchas veces se utilizan diferentes lotes y marcas comerciales que aportan variabilidad.

El agua destilada es un insumo fundamental en la preparación de los medios, y la misma debe cumplir con las características expuestas en la Norma ISO 7218 para su utilización en microbiología.

Un requisito previo para garantizar su calidad, es que los medios de cultivo cumplan con los criterios de funcionamiento mínimos, realizando análisis para demostrar la aceptabilidad de cada lote, evaluando que el medio cumple con el objetivo perseguido (enriquecimiento u aislamiento de un microorganismo o grupo) y es capaz de proporcionar resultados consistentes (prueba de rendimiento de los medios de cultivo donde se observa la respuesta de los mismos ante los microorganismos bajo análisis). El cumplimiento de este cometido minimiza la variabilidad, pero las variaciones que sufra un medio de cultivo o reactivo a lo largo del tiempo, serán fuentes de incertidumbre a considerar.

8.2.8 Condiciones de almacenamiento

La calidad y vida útil de los medios de cultivo y reactivos dependerá de las condiciones de almacenamiento. Deben cumplirse las instrucciones del fabricante en cuanto a exposición solar, humedad o temperaturas ideales de guardado para evitar cualquier modificación de su composición.

Cuando las muestras a ensayar son almacenadas un tiempo hasta el análisis, deben conservarse bajo condiciones óptimas a fin de no modificarse los recuentos bacterianos.

Se deben asegurar las condiciones de conservación y mantenimiento de cepas de referencia y trabajo (según disponibilidad de recursos, como esferas a -70 °C o liofilización) para evitar mutaciones o alteraciones de sus características fenotípicas.

Tanto la temperatura como la duración del tiempo de almacenamiento son variables a controlar y por lo tanto, fuentes de incertidumbre, por ello debe monitorearse la temperatura ambiente, de heladeras, freezers y ultrafreezers mediante el uso de registradores continuos de temperatura (data loggers) y termómetros, ambos calibrados.

8.2.9 Condiciones de incubación

La estabilidad de las bacterias en la muestra puede modificarse incluso durante el ensayo por cambios en el régimen térmico.

Son claves en microbiología los efectos térmicos que tienen aporte considerable sobre la incertidumbre: incubadoras no calibradas o calibradas en temperaturas diferentes a las de trabajo, la no realización de perfil térmico para garantizar homogeneidad de la temperatura en la cámara, la falta de verificación y mantenimiento del equipamiento o el incumplimiento del control diario mediante termómetros o registradores de datos continuos (data loggers) calibrados. El objetivo es demostrar el control de este parámetro.

8.2.10 Efectos de esterilización

El uso de autoclaves o estufas de esterilización en los que no se cumplan los tiempos y temperaturas específicas para el fin, tiene influencia en el resultado final: los medios de cultivo esterilizados de manera inapropiada modifican su performance analítica y la esterilización ineficiente del material de vidrio puede llevar a falsos recuentos.

Por lo tanto, es requisito la utilización de equipamiento calibrado (a las temperaturas de uso), verificado y bajo mantenimiento planificado como así también todo sistema de control calibrado (termómetros y/o data loggers). Además, es necesaria la aplicación de un sistema de aseguramiento de la calidad, realizando controles estrictos de esterilidad de los materiales a utilizar.

8.2.11 Lectura, interpretación y comunicación de los resultados

El analista tiene en este apartado una especial responsabilidad y es influyente su calificación para el propósito asignado: errores en el conteo de las colonias o en el cálculo final (redondeo, factores de dilución, etc.) son causas de interpretaciones erróneas y resultados mal informados. Además, se suma la impericia que puedan tener algunos profesionales en el desconocimiento del comportamiento atípico de algunos microorganismos en medios de cultivo confirmatorios o la interpretación distinta que pueda llevar a resultados completamente diferentes o erróneos. Estos efectos son difíciles de predecir y son considerados para la estimación de la incertidumbre aunque pueden ser corregidos y minimizarse con la contratación de personal idóneo, capacitación de los

profesionales de área y validación de sus competencias para reducir la disparidad incluso entre pares (repetitividad entre analistas).

8.2.12 Condiciones de instalaciones y ambientales

A pesar de mantener bajo la más estricta estabilidad las condiciones ambientales, es imposible lograr su variación. Muchas variaciones suelen considerarse despreciables pero en conjunto contribuyen a la incertidumbre global.

El laboratorio debe poseer características edilicias específicas para asegurar que el ambiente en el que se realizan los ensayos no afecte el resultado final. El diseño de las instalaciones debe evitar la contaminación cruzada. Los análisis deben realizarse bajo una atmósfera de baja contaminación y polvo ambiental, y debe evitarse cualquier condición extrema (temperatura, vapor, vibración, ruido, humedad, interferencias electromagnéticas, etc.) que pueda tener efecto en las mediciones o en la estabilidad de la muestra.

Muchos de estos aspectos se logran con procedimientos de limpieza y desinfección (POES) bien definidos de las áreas, sectorización de zonas de trabajo, comprobación periódica de la calidad microbiológica de las superficies y del aire (con verificación y mantenimiento de cabinas de bioseguridad y flujos de aire).

8.2.13 Otros

Además de las principales fuentes de variabilidad expuestas, deben siempre considerarse las posibles fuentes aleatorias de incertidumbre.

Por ejemplo, el componente de incertidumbre asociado al tiempo de retención de la muestra o de duración del proceso de ensayo se podría considerar mínimo si las pruebas se ejecutan dentro del tiempo especificado por la norma seguida.

Cada método utilizado posee una performance propia lo que tendrá una incertidumbre característica y diferente a otro método de ensayo.

8.3 Estimación de la incertidumbre de medida

La evaluación de la incertidumbre no es una tarea sencilla y aunque fuera posible cuantificar cada fuente de incertidumbre descrita en 8.2, el cálculo de la incertidumbre total sería muy complejo.

Existen varios enfoques para el cálculo de la incertidumbre, cada uno con distinto grado de dificultad. El laboratorio debe considerar las ventajas y obstáculos para la elección de alguno.

La "Guía para la expresión de la incertidumbre de medición"(GUM) indica dos formas posibles de evaluación de la misma:

- Tipo A: utilizando métodos estadísticos de una serie de observaciones
- Tipo B: utilizando métodos no estadísticos

Mientras la evaluación tipo A estima la incertidumbre a partir de mediciones repetidas (actuales o previas llevadas a cabo bajo idénticas condiciones) mediante una desviación estándar, la evaluación tipo B toma datos de mediciones previas, ya sea de datos de incertidumbre expandida correspondientes a instrumentos de medición, de certificados de calibración de equipos o a partir de tablas, referencias, especificaciones de instrumentos de medida, normas, etc. A partir de los datos obtenidos, ya sea de incertidumbres expandidas de certificados de calibración o de resolución de instrumentos de medida (donde se conoce el modelo de distribución (normal; rectangular)), se calcula la incertidumbre estándar $u(x_i)$.

Una vez conocidas las $u(x_i)$ de cada componente (evaluadas por el método tipo A ó B), y considerando al proceso de medición como una asociación de mediciones independientes, se deben combinar para obtener una incertidumbre estándar combinada $u_c(y)$ que representa un intervalo que contiene el valor verdadero con una probabilidad definida y supone que los valores posibles del mensurando siguen una distribución Normal.

Finalmente se calcula la incertidumbre expandida (U) multiplicado la $u_c(y)$ por un factor de cobertura (k) (su elección se basa en el nivel de confianza deseado: para distribuciones normales aproximadamente el 95 % de los resultados caen dentro del intervalo cuando $k=2$). Es decir, la U es el intervalo en el cual se cree que cae el valor verdadero del mensurando con un nivel de confianza particular

Pero esta forma de cálculo de incertidumbre a pesar de ser un método sistematizado, es laboriosa ya que exige un análisis riguroso de cada uno de los componentes individuales del procedimiento de medida, como de los errores aleatorios y sistemáticos de cada paso y se aplica principalmente a aquellos analitos de naturaleza química.

Dadas las características de los ensayos microbiológicos, una de las dificultades es la cuantificación de cada contribución individual de incertidumbre al proceso de medida, pero como lo indica la norma ISO 17025:2017, si no es posible evaluar rigurosamente la incertidumbre, se debe hacer una estimación razonable con fundamentación teórica.

Aunque en microbiología algunos componentes de incertidumbre podrían determinarse sencillamente, existen otras fuentes de variabilidad que son imposibles de cuantificar mediante experimentos individuales, como lo es por ejemplo, el estado fisiológico de las bacterias, el efecto de las fluctuaciones de temperaturas durante las incubaciones, etc. Existe también una dificultad asociada a los materiales de referencia certificados (cepas) ya que muestran un comportamiento diferente asociado a la matriz con la que se trabaje.

Igualmente estos efectos se consideran mínimos cuando se los compara con la incertidumbre asociada a la distribución de los microorganismos en la muestra. Además, con los métodos antes expuestos, se obtendría una incertidumbre con la consideración que los valores del mensurando siguen un modelo de Distribución Normal, pero los microorganismos en la naturaleza se comportan más bien según un modelo de Distribución de Poisson o Binomial negativa.

Existen otros dos enfoques basados en la aplicación de la precisión analítica (error aleatorio) y el sesgo (error sistemático):

- Método Bottom-Up
- Método Top-Down

El método Bottom-Up (componente a componente) implica la descomposición del proceso (y la identificación de todas las fuentes de incertidumbre) de medida en procesos individuales para luego combinarlos en actividades comunes y se estima la contribución al valor combinado de incertidumbre del proceso de medición. Al igual que el método propuesto por GUM, es muy laborioso y tiene mejor aplicación para determinaciones físicas que para el caso de microbiología de alimentos, ya que existe posibilidad de perder o subestimar fuentes de incertidumbre significativas y la dificultad de cuantificar con exactitud la contribución a la variabilidad de algunos componentes (por ejemplo,

fluctuaciones de temperatura en incubadoras, matrices, o la calidad de medios de cultivo) del proceso analítico microbiológico ya que considera que:

- El “analito” es un organismo vivo y su estado fisiológico es altamente variable.
- El “analito” puede ser en realidad un grupo de microorganismos (diferentes cepas, géneros y especies).
- Existe heterogeneidad de las matrices por la distribución microbiana

En cambio, el método Top-Down es simplificado y utiliza datos de precisión obtenidos de la validación o verificación del método que pueden surgir de muestras de control analizadas por el laboratorio, ensayos de aptitud o de colaboración entre laboratorios. Estos datos aportan información más fidedigna sobre la incertidumbre de medición para ensayos microbiológicos y es una ventaja cuando se disponen de datos históricos del método en el propio laboratorio.

Si bien la norma ISO 17025 no especifica ninguna aproximación para la estimación de la incertidumbre, el OAA propone en la “Guía para la validación de métodos microbiológicos” dos modelos a seguir.

Uno de ellos utiliza el cálculo de precisión intermedia según los lineamientos de la norma ISO 5725-3. Con la misma, se tienen en cuenta las fuentes de incertidumbre significativas y tiene aplicabilidad cuando los recuentos de los replicados se encuentran en un rango definido por el método seleccionado. Lamentablemente, este modelo no se puede aplicar para el caso de recuentos bajos ya que el coeficiente de variación (CV) será significativamente alto.

El otro modelo propuesto y desarrollado por ISO/TC 34/SC 9 para ensayos microbiológicos en alimentos es la norma ISO/TS 19036:2006 y su Adm1:2009 que se basa en la estimación de la incertidumbre experimentalmente mediante el cálculo de la desviación estándar de reproducibilidad (S_R) del resultado final del proceso de medición. Este método, también conocido como Enfoque Global o “Top-Down” considera al ensayo en forma global y no en sus etapas individuales y así tiene en cuenta la variabilidad de todo el proceso de medición (incluyendo tanto el componente aleatorio (precisión) como el sistemático (Sesgo)). La S_R calculada, representa la incertidumbre estándar combinada $u_c(y)$.

El Enfoque Global, se podría ver como un modelo de caja negra, donde reúne las principales fuentes de incertidumbre intervinientes en un ensayo de medida. Este enfoque es más simple ya que se considera una distribución de Poisson y puede calcularse la S_R mediante tres posibilidades:

- S_R intralaboratorio (caso particular de precisión intermedia según la norma ISO 5725-3)
- S_R interlaboratorio derivado de la validación del método
- S_R interlaboratorio derivado de ensayos colaborativos

Este último modelo es el elegido en el presente trabajo por considerarse una metodología de estimación de incertidumbre conveniente para el LMA en sus ensayos microbiológicos cuantitativos de alimentos dada su versatilidad para diferentes tipos de matrices alimenticias, métodos y sencillez. Se aplicará el cálculo del S_R intralaboratorio del resultado final del proceso de medida para la estimación de la incertidumbre mediante un protocolo experimental.

Aplicar este enfoque significa la inclusión al proceso global de fuentes de incertidumbre que serían despreciables con otros métodos, y exige que el laboratorio pueda demostrar que el método a evaluar se encuentra bajo control, es decir, que evidencie que conoce los factores asociados con probabilidad de afectar la medición y que trabaja bajo condiciones óptimas tal de minimizar las variabilidades presentes en todas las etapas que el método lo requiera.

8.4 Expresión del resultado

Una vez finalizada la estimación de la incertidumbre por el método elegido por el laboratorio (y la obtención de la incertidumbre expandida U), el paso siguiente es la correcta expresión del resultado final (Y) de un ensayo en el informe según la siguiente forma:

$$Y = y \pm U$$

Donde,

y : resultado del ensayo de medida obtenido por el laboratorio

En los ensayos microbiológicos, los resultados comunmente se expresan con la/s unidad/es: ufc/ml ó ufc/g.

9. Consideraciones de la norma ISO/TS 19036:2006 para el protocolo experimental

9.1 Fuentes de incertidumbre críticas

Cuando se explica la forma de evaluar la incertidumbre de medición mediante el Enfoque Global, esta norma utiliza el modelo de caja negra para describir al ensayo analítico como un proceso, donde se consideran múltiples entradas y como única salida el resultado del mismo.

Estas entradas son variadas fuentes de incertidumbre y a pesar de conocer las principales, se las considera en forma simultánea en vez de hacerlo separadamente. Según la norma, las más importantes fuentes de variabilidad para los ensayos microbiológicos de alimentos son:

- Muestreo y muestra analítica
- Equipos, medios de cultivo y reactivos
- Sub-muestreo y dilución primaria
- Matriz
- Errores aleatorios
- Analista y tiempo
- Sesgo

Existen otras fuentes de variabilidad aleatoria que en realidad son evaluadas por el laboratorio bajo condiciones de reproducibilidad.

Cuando se quiere estimar, como en el presente trabajo, la incertidumbre mediante la S_R intralaboratorio, el protocolo experimental excluye dos fuentes:

- El muestreo: es tal vez el mayor componente de variabilidad que se introduce pero no es parte de la incertidumbre ligada a la medición propiamente dicha.

- El Sesgo: su excepción se debe a la naturaleza empírica de los resultados microbiológicos. Por más que se utilicen materiales de referencia certificados o se obtengan valores derivados de ensayos de interlaboratorios, es imposible conocer el valor verdadero que se requiere para calcularlo. Se puede conocer parte del Sesgo evaluando la S_R de ensayos de interlaboratorios, pero si no fuese posible evaluar el componente de incertidumbre del mismo, debe demostrarse que el laboratorio lo mantiene bajo control participando en ensayos interlaboratorios o evaluando materiales de referencia certificados en intralaboratorios.

9.2 Microorganismo (o grupo)

La incertidumbre debe estimarse para cada tipo de microorganismo target (o grupo que se considere que aporte similar valor de incertidumbre).

9.3 Métodos

La incertidumbre debe estimarse para cada método que el laboratorio utilice para sus ensayos.

9.4 Matrices y muestras

La incertidumbre debe estimarse para cada tipo de matriz (o grupo que se considere que aporte similar valor de incertidumbre) ya que la distribución de los microorganismos es propia de cada una.

La mejor opción es trabajar con muestras reales, es decir, naturalmente contaminadas. Si no es posible, pueden utilizarse muestras artificialmente contaminadas pero el inconveniente es que nunca se obtiene una buena recuperación.

9.5 Grado y tipo de contaminación

Se recomienda trabajar con muestras con un grado de contaminación similar al que se encuentran en la naturaleza, y no es obligatorio estimar la incertidumbre para diferentes niveles de contaminación. Si fuera necesario contaminar las muestras artificialmente, debería no sólo estar presente el microorganismo a estudiar, sino también la misma flora (acompañante o competitiva) tal de garantizar un comportamiento similar a las muestras

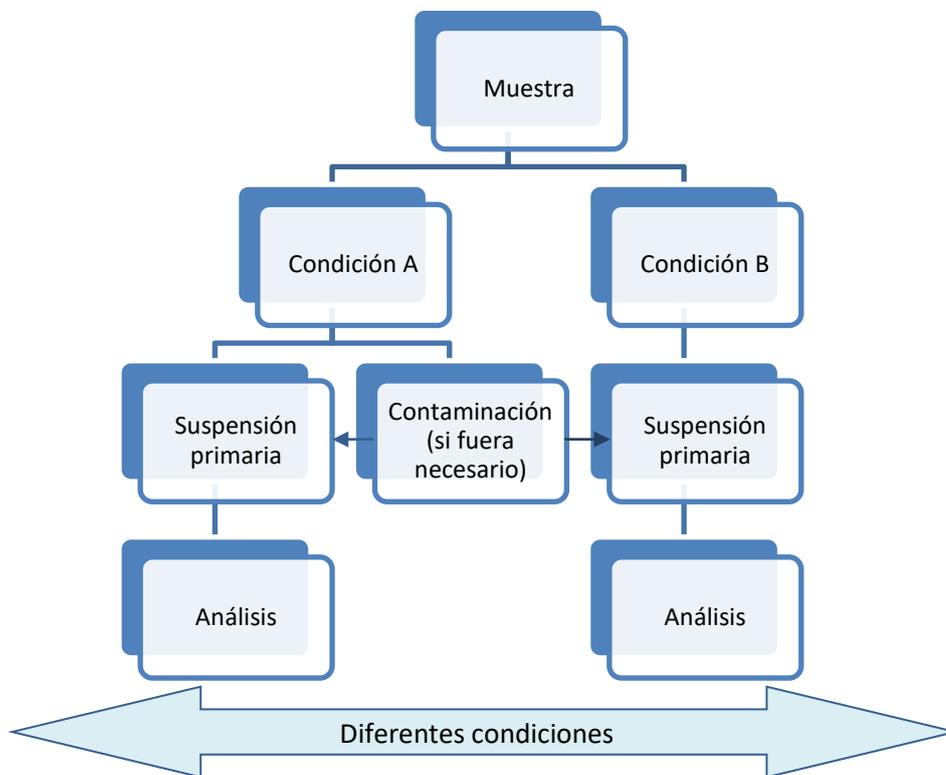
naturales (heterogeneidad o condiciones de estrés de los microorganismos en la muestra), situación bastante compleja de obtener.

El hecho de tener que inocular una dilución primaria con un microorganismo, suma un nuevo componente de incertidumbre debido a la heterogeneidad de la matriz obtenida, pero no se toma en cuenta.

Siempre que sea posible, como se indicó en 9.4, se debe trabajar con muestras naturalmente contaminadas.

9.6 Protocolo experimental propuesto

El ensayo debe organizarse según el siguiente esquema:



Deben evaluarse al menos 10 muestras por duplicado ($n \geq 10$) de la misma matriz, realizando la repetición del protocolo en diferentes días en el mismo laboratorio (sólo para el caso de alimentos que se demuestre su estabilidad en el tiempo) de forma de cubrir todas las fuentes de variabilidad posibles en las condiciones de operación A y B: diferentes operadores, lotes y batches de medios de cultivo utilizados, incubadoras, homogeneizadores, pipetas, balanzas, autoclaves, medidores de pH, tiempo de análisis y de incubación, etc.

9.7 Recuentos esperados

El protocolo experimental debe estar diseñado de tal manera que se obtengan preferentemente recuentos superiores a 30 ufc en las placas de Petri, ya que a partir de este valor, la distribución de Poisson tiende a aproximarse a una distribución Normal. Pero, la estimación de la incertidumbre siguiendo esta norma es también aplicable para bajos recuentos. Ésta es una corrección de la norma (AMENDMENT 1) donde el error aleatorio que aporta la distribución de Poisson, es tenido en cuenta en la estimación de la incertidumbre expandida (U) (9.10).

Mientras que los resultados de recuentos menores a 10 ufc deberían excluirse, aquellos recuentos entre 10-30 ufc por placa se incluyen sólo si la S_R que está siendo estimada se espera que sea mayor a $0.2 \log_{10}(\text{ufc/g})$ ó $0.2 \log_{10}(\text{ufc/ml})$.

El valor de ufc que se expresa en la ecuación de cálculo como $\sum C$ corresponde a la suma de todas las colonias contadas en las diferentes diluciones de un mismo ensayo.

9.8 Transformación de los datos a logaritmo

Dado que los microorganismos en la naturaleza siguen un modelo de distribución tipo Poisson o Binomial Negativa, es necesario realizar una transformación logarítmica (\log_{10}) a los recuentos obtenidos (en ufc/g ó ufc/ml) con el fin de “normalizar” dichas distribuciones para realizar el cálculo de incertidumbre en métodos microbiológicos.

9.9 Estimación de la incertidumbre combinada

La incertidumbre combinada $u_c(y)$ está representada por la desviación estándar de reproducibilidad (S_R) experimental intralaboratorio del resultado final de la medición, que se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$S_R = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}} \quad (1)$$

Donde,

n: número de muestras analizadas

S_R : desviación estándar de reproducibilidad expresada en logaritmo

y_{iA} e y_{iB} : logaritmo de los recuentos (duplicados) obtenidos ($\log_{10}(\text{ufc/g})$ ó $\log_{10}(\text{ufc/ml})$) en diferentes condiciones A y B.

9.10 Cálculo de la incertidumbre expandida

Es necesario comprender que el cálculo de la incertidumbre estándar expandida (U) se realiza cada vez que se desea informar el resultado del recuento de una muestra, donde se ha realizado previamente el cálculo de S_R para la misma matriz o grupo similar.

La clave del cálculo, dependerá del recuento obtenido en cada muestra en particular, ya que la contribución de la distribución de Poisson varía de acuerdo al número de colonias como se indica a continuación.

La siguiente fórmula se utiliza para el cálculo de la incertidumbre estándar expandida (U) expresada en logaritmo:

$$U = 2 \sqrt{S_R^2 + \frac{0.18861}{\Sigma C}} \quad (2)$$

Donde,

2: factor de cobertura (k)

ΣC : es la suma del número total de colonias contadas en todas las placas.

$0.18861/\Sigma C$: es el componente de la varianza a causa de la distribución de Poisson.

Para recuentos altos, el término $0.18861/\Sigma C$ se hace despreciable y la ecuación se simplifica

(siempre que $\Sigma C > C_{lim} \approx \frac{1.75}{S_R^2}$):

$$U = 2 S_R \quad (3)$$

En el caso de bajos recuentos ($\Sigma C \leq C_{lim}$) se debe utilizar la ecuación (2).

9.11 Expresión del resultado

El resultado final se puede expresar de alguna de las siguientes formas:

9.11.1 Intervalo expresado en logaritmos:

$$y \pm U [\log_{10}]$$

9.11.2 Límites de variación expresados en logaritmos:

$$y \log_{10} [y-U, y+U]$$

9.11.3 Límites de variación expresados como valor absoluto:

$$x \text{ (ufc/g ó ufc/ml) } [10^{y-U}, 10^{y+U}]$$

9.11.4 Límites de variación expresados en valor relativo:

$$x \text{ (ufc/g ó ufc/ml) } [-(1-10^{-U})x100\%, +(-1+10^{+U})x100\%]$$

Nota: de acuerdo a la manera que expresa sus resultados el LMA, la opción 9.11.3 es la elegida para informar sus ensayos.

10. Protocolo experimental propuesto para el LMA

El siguiente protocolo se acordó con el jefe del LMA porque el ensayo cuantitativo manifiesta gran variabilidad de resultados, se pueden recibir múltiples muestras para su análisis y utiliza recursos disponibles en el laboratorio.

Una vez introducida la metodología, se propone este mismo esquema para la evaluación de otras matrices y métodos.

Para su desarrollo se eligió una matriz alimentaria que ha mostrado gran variabilidad de resultados de acuerdo a la experiencia. Las muestras utilizadas de la misma matriz han arrojado resultados lo suficientemente variables como para cubrir los diferentes grados de contaminación natural. A pesar de que la matriz elegida (deshidratada) se cree que es lo suficientemente estable, los ensayos se realizaron en un lapso no mayor a 20 días.

El protocolo consta de cuatro etapas que se desarrollan a continuación:

Etapas 1: Definición del mensurando

Etapas 2: Identificación de las fuentes de incertidumbre

Etapas 3: Estimación de la incertidumbre

Se recomienda seguir los lineamientos del mismo para otras evaluaciones futuras.

EVALUACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE PARA ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS CUANTITATIVOS

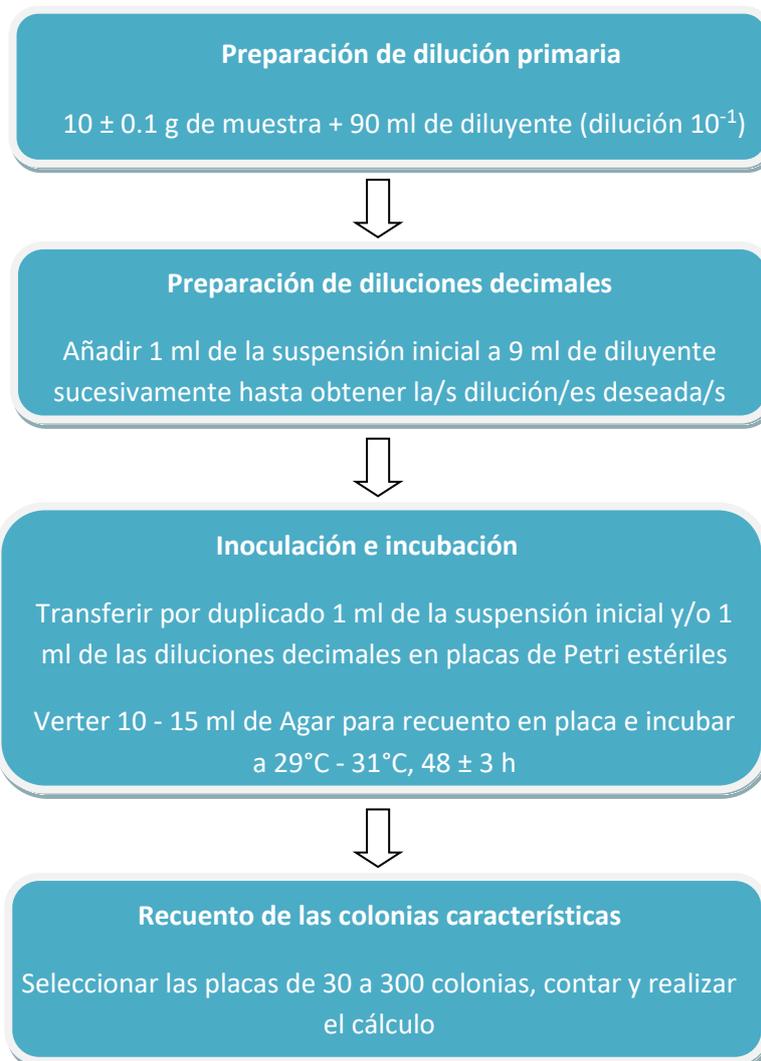
Ensayo	Recuento de aerobios mesófilos totales
Método	Enumeración de microorganismos aerobios mesófilos. Método de recuento en placa. ICMSF
Procedimiento	PCP 1-CVM MA N°008
Matriz	Jengibre deshidratado
Fecha de inicio	20/02/2018
Redactado por	Paola Lorenzo Analista profesional del Laboratorio de Microbiología Agrícola
Revisado por	Soledad Manino Analista del Laboratorio de Microbiología Agrícola
Aprobado por	M. Inés Giménez Jefe del Laboratorio de Microbiología Agrícola

ETAPA 1: DEFINICIÓN DEL MENSURANDO

Este método permite el recuento de microorganismos capaces de desarrollar en presencia de oxígeno y a una temperatura óptima de 30 ± 1 °C.

Corresponde a un grupo de microorganismos (bacterias, mohos y levaduras), es decir, la microflora total sin especificación del/los tipo/s de microorganismo/s presentes.

El método sigue el siguiente flujo:



ETAPA 1: DEFINICIÓN DEL MENSURANDO

El cálculo para la expresión del resultado es:

$$N = \bar{X} \times \frac{1}{V \times d}$$

Donde:

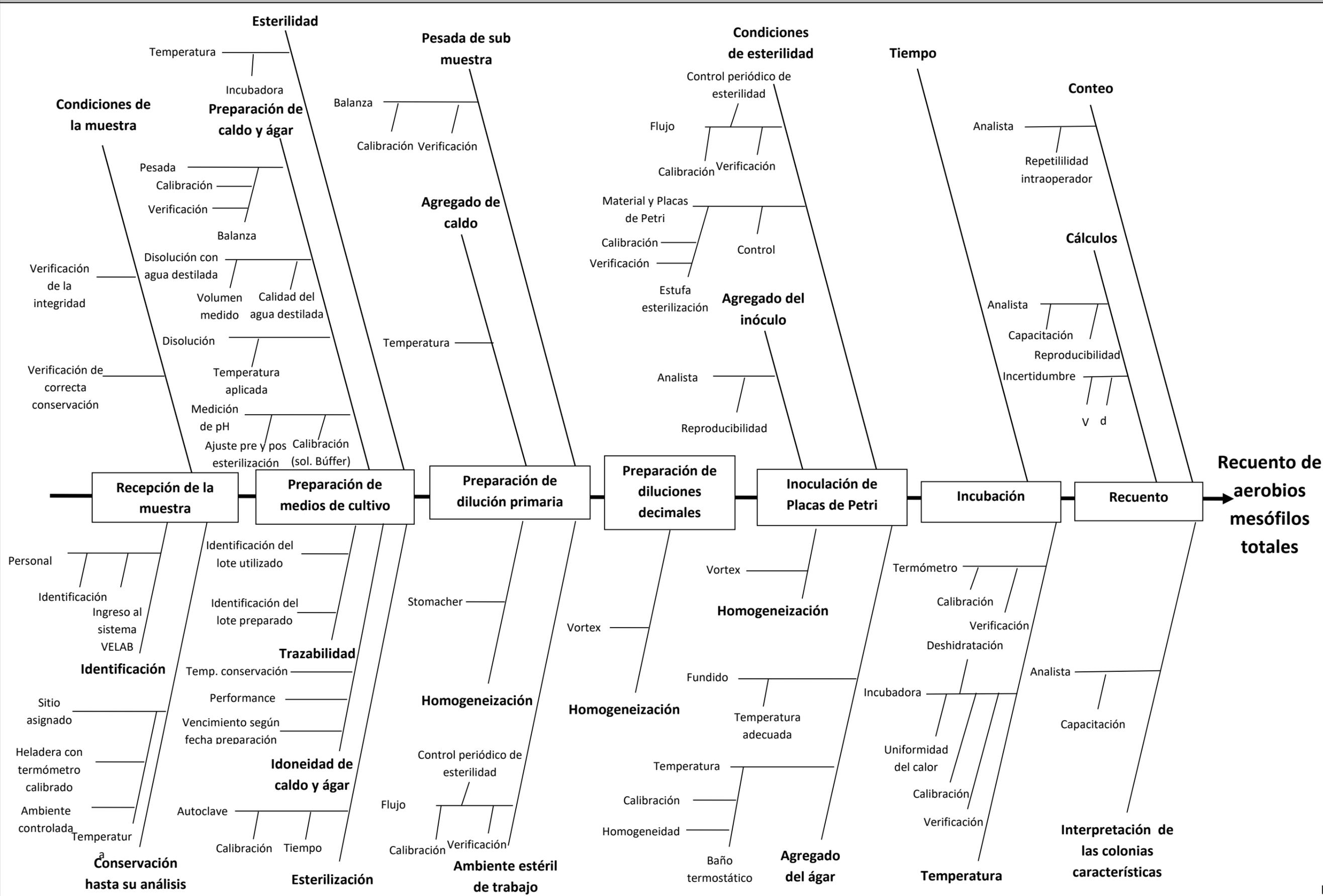
N = número de microorganismos expresados como ufc/g ó ufc/ml

\bar{X} = media aritmética de las colonias contadas en dos placas de Petri de la misma dilución (en las que se obtienen recuentos entre 30-300 colonias)

V = volumen de inóculo en las placas en ml

d = Dilución correspondiente a la placas contadas

ETAPA 2: IDENTIFICACIÓN DE LAS FUENTES DE INCERTIDUMBRE



ETAPA 3: ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE

Definición de los parámetros

A y B: Condiciones de operación diferentes de la misma muestra

$x_{iA/B}$: media de los recuentos obtenidos (en ufc/g ó ufc/ml) en la condición A ó B

Descripción de realización del protocolo

Los ensayos se realizaron con diez muestras de la misma matriz naturalmente contaminada y con distintos grados de contaminación tal como fueron recolectadas entre los meses de Febrero a Noviembre de 2018. Se realizaron los ensayos independiente y paralelamente por dos analistas, cubriendo las mayores fuentes de variabilidad en un lapso de tiempo de 60 días (el tipo de muestra elegido, por no ser perecedera, lo permitía). Se utilizaron diferentes lotes y batches de medio de cultivo para diluciones y plaqueo, se cambiaron las estufas de cultivo, se alargó el tiempo de incubación, se utilizaron diferentes pipetas y material volumétrico y balanzas.

Resultados

i	Fecha de siembra	x_{iA}	$y_{iA}=\log_{10}(x_{iA})$	x_{iB}	$y_{iB}=\log_{10}(x_{iB})$	$\frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}$
1	20/02/18	1,05E+07	7,02	3,00E+07	7,48	0,1039
2	25/04/18	7,50E+06	6,88	5,00E+06	6,70	0,0155
3	14/05/18	7,15E+06	6,85	4,50E+06	6,65	0,0202
4	23/05/18	1,10E+07	7,04	8,95E+06	6,95	0,0040
5	19/06/18	7,80E+06	6,89	9,50E+06	6,98	0,0037
6	10/07/18	1,07E+05	5,03	2,28E+05	5,36	0,0540
7	05/09/18	3,12E+07	7,49	7,30E+07	7,86	0,0681
8	11/09/18	8,20E+03	3,91	1,85E+04	4,27	0,0624
9	23/10/18	2,54E+08	8,40	8,05E+07	7,91	0,1245
10	19/11/18	3,14E+06	6,50	4,71E+06	6,67	0,0155

Cálculo de la desviación estándar de reproducibilidad (S_R)

$$S_R = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}} = \boxed{0,22} \text{ (log}_{10}\text{) ufc/g}$$

Nota: Para el valor de S_R obtenido, corresponde un valor de C_{lim} 36

11. Conclusiones

Una de las responsabilidades del LMA es garantizar la validez y confiabilidad de sus resultados de manera de poder tomar decisiones que se refieran a la inocuidad y calidad sanitaria de los alimentos.

Los objetivos planteados en el presente trabajo han podido ser cumplidos y se espera que los lineamientos propuestos sirvan como una herramienta sistemática que utilice el LMA para la concreción de una evaluación pendiente y que es parte de un requisito de la norma ISO 17025.

El método planteado para la estimación de la incertidumbre es práctico y permitirá ensayar nuevas matrices y podrá tenerse un mayor conocimiento de las fuentes de variabilidad que afectan los resultados entregados por el laboratorio.

El resultado obtenido (S_R) para la matriz evaluada en este protocolo experimental, es muy similar al informado en la Tabla A.1 del anexo A de la norma ISO 19036 (recuento de aerobios mesófilos). De acuerdo a la clasificación de matrices descripta, la muestra de jengibre deshidratado corresponde a la categoría III (sólidos pequeños y muy pequeños) y para el caso de hongos deshidratados la tabla arroja un valor S_R de 0.26 log, comparable con el valor 0.22 log obtenido en este protocolo.

El laboratorio deberá estimar la incertidumbre de las matrices que crea conveniente y deberá actualizar la misma cada vez que existan modificaciones metodológicas de relevancia, esto es, cambios en el equipamiento y/o instrumental que participa del ensayo o cualquier otra modificación crítica que afecte la medición.

Debe establecerse una frecuencia de revisión y en caso de necesidad, realizarse un nuevo cálculo del parámetro S_R .

S_R puede utilizarse como un indicador de la performance del laboratorio para cada matriz y método en los casos en que se considere que ha resultado alto su valor (en este caso debería actualizarse su cálculo periódicamente como un plan de evaluación de la eficacia de medidas tomadas para minimizar su valor).

Uno de los propósitos del laboratorio de microbiología es, no sólo poseer procedimientos documentados donde se detallan las acciones que demuestran que las fuentes de incertidumbre se mantienen bajo control, sino también, registros de estimación de la

incertidumbre, con el fin, cuando sea necesario, de poder minimizarlas. Ello se logra, con estrictos controles de calidad internos, con la aplicación de aseguramiento de la calidad en todas las etapas del proceso, con la verificación y/o validación de los métodos, el análisis de los datos de acuerdo a la historia del ensayo y la participación en rondas interlaboratorio. Esto último, ayuda a evaluar otro componente de incertidumbre, el cual también es necesario demostrar que se encuentra bajo control.

Estimar la incertidumbre en el laboratorio, es un modo de autoevaluación y conocimiento de la calidad con la que el mismo emite sus resultados y brinda información que debe ser analizada por cada laboratorio con el objetivo de mejorar constantemente su desempeño.

12. Referencias

- IRAM 301 (ISO/IEC 17025) - Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- ISO/TS 19036 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. First edition, 01/02/2006
- ISO/TS 19036 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Amendment 1: Measurement uncertainty for low counts. First edition, 01/02/2006 / Amd 1:2009 (E)
- AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. Journal of AOAC Int. Vol. 85, No 5, 2002
- Oficina Internacional de Pesos y Medidas (BIPM). Vocabulario Internacional de Metrología - Conceptos fundamentales y generales y términos asociados (VIM). JCGM 200:2008. JCGM 200:2008 Corrigendum. May 2010.
- Guía para la validación de métodos microbiológicos. OAA. Versión 1, Junio 2013
- Codex Alimentarius. Principios y directrices para el establecimiento y la aplicación de los Criterios Microbiológicos para los alimentos: CAC/GL 21 – 1997

- Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM 1995 with minor corrections) JCGM 100:2008
- Uncertainty of measurement precisión and limits of detection in chemical and microbiological testing laboratorios. Technical guide. International Accreditation New Zealand. 2004
- Accreditation for microbiological laboratories. Eurachem Guide Ed. 2013
- A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food microorganisms. J.Corry. Food Microbiology 24 (2007) 230-253
- Guía para la detección de las fuentes de incertidumbre en métodos microbiológicos en alimentos. Grupo técnico de Microbiología de la Red Interamericana de Laboratorios de Análisis de Alimentos (RILAA) Junio 2013
- Mikes. Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. J4:2003
- Methods for microbiological examination of food and animal feeding stuffs: General Laboratory Practices ISO 7818: 2007