

Reproducibilidad y repetibilidad en el recuento de microorganismos mesófilos totales como una base para el cálculo de incertidumbre

Pozo, L.⁽ⁱ⁾-Mucchiut, M. ⁽ⁱ⁾; Olmedo, M.⁽ⁱ⁾; Cattapan, R.⁽ⁱ⁾; Ziolo, J.⁽ⁱ⁾; Peralta Apeseche, J.⁽ⁱ⁾; Alvarez, M.⁽ⁱ⁾

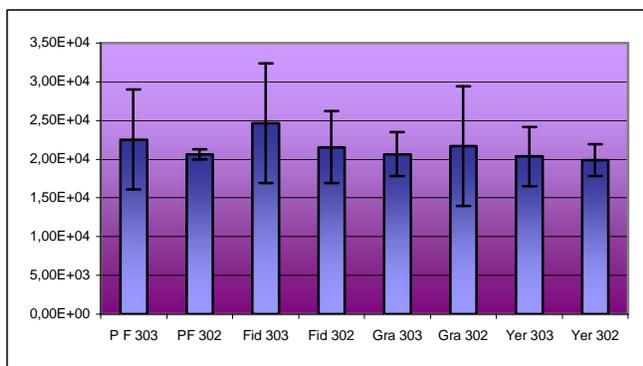
⁽ⁱ⁾INTI-Cereales y Oleaginosas

Introducción

Históricamente el criterio para la evaluación de los resultados de recuento de microorganismo totales ha estado sujeto a apreciaciones de la persona que lo evalúa, siendo muy común que haya discrepancias entre los criterios de equivalencia entre dos resultados similares.

Una serie de problemas que habitualmente se presenta en los ensayos microbiológicos al querer aplicar conceptos estadísticos es la falta de conocimiento del valor verdadero del recuento de microorganismos y de la distribución no homogénea de estos en la muestra.

Dado que no existen valores de referencia internacionales sobre la reproducibilidad (R) y la repetibilidad (r) para recuento en placa en matrices vegetales, el presente trabajo intenta establecer estos valores para ser utilizados por el laboratorio como referencia interna en los métodos FDA-BAM (ME 302)^[2] y por 3M Petrifilm (ME 303)^[1]. Estos valores podrán utilizarse como base para el cálculo de la incertidumbre de los resultados obtenidos.



Gráf. 1: Recuento de microorganismos en las diferentes matrices para un mismo inóculo: $1,9 \cdot 10^4$ UFC/g.

A través del establecimiento de los parámetros de R y r para un conjunto matrices en cada uno de los métodos ME 302 y ME 303, se podrá estimar la incertidumbre de los resultados.

El cálculo de la incertidumbre propuesto abarca las desviaciones debidas a la matriz y los operadores.

Metodología / Descripción Experimental

Se utilizaron cinco matrices alimentarias de origen vegetal, que abarcan la mayoría de las muestras analizadas comúnmente por el Laboratorio de Microbiología del INTI-Cereales y Oleaginosas: granas para torta (Gra), mayonesa (May), yerba mate (Yer), fideos secos (Fid) y papas prefritas supercongeladas (P F).

Se prepararon las muestras en tres frascos por alimento conteniendo cada uno $10,0 \pm 1,0$ g del producto. Las muestras fueron esterilizadas en autoclave a 121°C durante 40 minutos para asegurar la ausencia de microorganismos viables.

Al momento de desarrollarse el análisis cada muestra se inoculó con tres niveles de inóculo de diferentes concentraciones de *S. aureus* ATCC 25923. Se utilizaron concentraciones de inóculo tal que por ejemplo para la muestra denominada Gra el frasco 1 tenga una concentración final de 10^3 , frasco 2: 10^4 y frasco 3: 10^5 UFC/g (Unidades Formadoras de Colonias).

Desarrollo de los métodos:

- Cálculo de r: cada una de las muestra fue analizada por un único operador en los dos ensayos y para cada una de las diluciones se utilizó cinco placas (ver ecuación 1).
- Cálculo de R: en esta ocasión cada muestra fue realizada por dos operadores diferentes y el recuento para cada dilución se realizó en una placa (ver ecuación 2).

En las ecuaciones (1) y (2) se muestra cómo se realizó el cálculo de r y R respectivamente.

$$r = \sqrt{\frac{[(n_{i1}-1) \times CV_{i1}^2 + (n_{in}-1) \times CV_n^2]}{[(n_{i1}-1) + (n_{in}-1)]}} \quad (1)$$

n_i = número de replicados para la matriz i .

CV_i = Coeficiente de variación calculado para la matriz i .

$$R = \sqrt{\frac{[(n_{i1}-1) \times CV_{i1}^2 + (n_{in}-1) \times CV_n^2]}{[(n_{i1}-1) + (n_{in}-1)]}} \quad (2)$$

n_i = número de replicados por ME i o por el operador i .

CV_i = Coeficiente de variación calculado para el ME i o por el operador i .

$$U = \sqrt{\frac{(r)^2 + (R)^2}{n}} \quad (3)$$

Resultados

En la tabla 1 y 2 se muestra la media de recuento de microorganismos para cada matriz; expresado como un rango de valores ($x \pm t S$, siendo t el factor de Student y S la desviación estandar).

En el gráfico 1 se muestra, a modo de ejemplo, la media del recuento para un valor 10^4 UFC/g con su respectiva desviación. Las desviaciones estandar observadas para el ME 302 son, en general, menores a las observadas para el ME 303, la excepción es la matriz "Gra" en donde ocurre lo contrario.

Matriz nivel de inóculo	PF 303	Fid 303	Gra 303	Yer 303	May 303
	X 10^3 (UFC/g)				
10^3	1.80±0.6	1.93±0.3	1.85±0.4	1.72±0.2	1.11±0.2
10^4	22.5±6.5	24.6±7.7	20.6±2.8	20.4±3.8	13.2±2.3
10^5	327±73	399±58	338±48	292±29	190±21

Tabla 1. Promedio del recuento de microorganismos por el ME303 $\pm t$ desv. St.

Matriz Nivel de inóculo	PF 302	Fid 302	Gra 302	Yer 302	May 302
	X 10^3 (UFC/g)				
10^3	1,79 ± 0,3	2,02 ± 0,3	1,64 ± 0,2	0,02 ± 0,1 ^(a)	1,14 ± 0,2
10^4	20,6 ± 6,47	21,6 ± 4,65	21,7 ± 7,74	19,9 ± 2,05	12,9 ± 2,59
10^5	319 ± 73,4	394 ± 88,9	345 ± 63,8	294 ± 43,3	189 ± 53,4

Tabla 2: Promedio del recuento de microorganismos por el ME302 $\pm t$ desv. St.

^(a) Hay un efecto de crecimiento negativo en la matriz "yerba" para el ME302.

Conclusiones

Comparando los porcentajes de desviación estándar promedio (Prom DS %) para

cada nivel de inóculo y los Prom DS % para cada matriz, observamos que estos valores se mantienen entre 6-7 % sin ser afectados por el nivel de inóculo. Sin embargo, la presencia de hidratos de carbono en la matriz afecta a este valor. Esto queda demostrado en la matriz Yer que, al no tener hidrato de carbono, presenta una menor Prom DS % comparada con el resto de las matrices.

Recuento (UFC/g)	Prom DS %
10^3	6
10^4	7
10^5	6

Tabla 3a

Matriz	Prom DS %
PF	7
Fid	7
Gra	7
Yer	4
May	7

Tabla 3b

Tabla 3a: Prom DS % promedio de todas las matrices para cada nivel de microorganismos

Tabla 3b: Prom DS % promedio de todos los niveles de microorganismos para cada matriz

Nivel de inóculo	ME303		ME302	
	Prom.	U	Prom.	U
10^3	1,7 10^3	0,4 10^3	1,3 10^3	0,2 10^3
10^4	2,0 10^4	0,5 10^4	1,9 10^4	0,4 10^4
10^5	3,1 10^5	0,4 10^5	3,1 10^5	0,3 10^5

Tabla 4: Resultados de r y R de acuerdo a los diferentes niveles de contaminación

La incertidumbre calculada (Ver tabla 4) a partir de r y R en la ecuación (3) será utilizada para la expresión de los resultados cuando así sea solicitado.

Por último, a través de ensayos intralaboratorios futuros y teniendo como referencia estos primeros valores, se podrá evaluar el mejoramiento del desempeño del laboratorio en estos métodos.

Referencias

- [1] ME 303 (Basado en técnicas recomendadas por FDA-BAM Online Enero 2001 Capítulo 3; AOAC 1995 Rev. Marzo 1998 Official Methods 990.12, Nota 3M, Instructivos y Guías de Interpretación de 3M Petrifilm™).
- [2] ME 302 (FDA-BAM Online Enero 2001).
- [3] Seppo I. Niemelä, "Uncertainty of quantitative Determinations Derived by Cultivation of Microorganisms" Advisory Commission for Metrology-Publication 2002/Finland.
- [4] Kornblit F., Puglisi C., "Evaluación de la Incertidumbre y Calidad de las Mediciones" INPPAZ-2004/Argentina, Bs. As.

Bioq. Larisa Pozo –
larapozo@inti.gov.ar