

Avaliação da consistência dos meios de contagem de aeróbios mesófilos

Introdução

O teste com Ágar Padrão para Contagem (PCA) fornece a um laboratório de teste de alimentos um nível de microorganismos presentes no produto sendo testado e pode ser usado para determinar a qualidade sanitária, a aceitabilidade organoléptica, a conformidade com as boas práticas de fabricação e, até certo ponto, a segurança do produto.^{1, 2, 3} Como todos esses requisitos são críticos para a capacidade de um fabricante de alimentos de utilizar o produto, testar APCs é uma parte significativa da rotina diária em um laboratório de testes de alimentos.

Selecionar o método apropriado para o teste de APC pode ser desafiador, pois existem vários métodos de teste, desde métodos rápidos e automatizados até métodos culturais tradicionais. É importante que um laboratório compreenda qual método melhor atende às suas necessidades. Duas dessas opções são a placa com Ágar Padrão para Contagem (PCA) e a Neogen® Petrifilm para Contagem de aeróbios mesófilos. Existem variações na formulação e produção do PCA, mas também há muitas variações em como esses meios são usados entre laboratórios. A placa de ágar tradicional envolve adicionar uma amostra a uma placa de Petri vazia, seguida pela adição de ágar temperado. As placas podem ser colocadas em uma única camada na bancada do laboratório ou podem ser empilhadas antes de adicionar o ágar temperado. As placas são então deixadas para esfriar antes de serem colocadas na incubadora. Este estudo avaliou a adição de ágar às amostras com as placas empilhadas e não empilhadas. O método de empilhamento é frequentemente usado para economizar tempo e espaço na bancada, mas estudos têm mostrado que as placas de ágar no centro da pilha não esfriam na mesma taxa que as placas no topo e na base da pilha.⁴ Isso pode levar a contagens mais baixas e, em última análise, a resultados inconsistentes se as placas empilhadas forem réplicas da mesma amostra. Essas variações podem contribuir para o desempenho inconsistente do método de contagem aeróbios mesófilos selecionado pelo laboratório.

Os produtos de três fabricantes globais de PCA, empilhados e não empilhados, foram comparados à Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos para determinar se há diferenças no desempenho de cada meio ao avaliar a consistência. O estudo foi realizado por três analistas diferentes em dias diferentes. Cada analista conduziu o protocolo do início ao fim, incluindo a preparação do meio, a preparação da amostra, a placa da amostra e a incubação.

Materiais e métodos

Meios e reagentes

- Solução salina peptonada, preparado de acordo com as instruções do fabricante, 90 mL
- Tampão fosfato de Butterfield, 90 mL, preparada na compra
- Água peptonada tamponada, 90 mL, comprada e preparada
- Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos
- Métodos padrão Ágar A
- Métodos padrão Ágar B
- Métodos padrão Ágar C
- Material de referência certificado para multiorganismos da NSI Lab Solutions
 - Material de referência certificado (CRM)
 - *Escherichia coli* NCTC^A 9001/ATCC^B 11775
 - *Klebsiella oxytoca* NCTC 8167
 - *Staphylococcus aureus* NCTC 6571/ATCC 9144
 - *Candida albicans* NCPF^C 3255/ATCC 2019

^A Coleção Nacional de Culturas de Tipos

^B Coleção Americana de Culturas-Tipo

^C Coleção Nacional de Fungos Patogênicos

Método

Preparação da amostra

O pH de cada diluente foi verificado para garantir que estivesse entre 6,6 e 7,2. O disco de MRC de levedura foi equilibrado à temperatura ambiente por cinco minutos e depois adicionado assepticamente a 90 mL de tampão (diluente). O diluente foi agitado para misturar e o disco foi deixado para dissolver completamente, aproximadamente 15 minutos.

Preparação das placas

Os ágar A, B e C foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Placas de Petri e placas Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos foram etiquetadas com o tampão, número de réplica e temperatura de incubação. Havia 10 placas por tampão e temperatura de incubação correspondente (Tabela 1) para cada opção de plaqueamento.

Tabela 1. Condições para todos os tipos de mídia.

Meios avaliados	Buffer (Diluente)	Incubação
Agar A, B, C, Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos	Solução Salina peptonada	30°C
Agar A, B, C, Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos	Tampão de Butterfield	32°C
Agar A, B, C, Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos	Água Peptonada Tamponada	35°C

Inoculação da Amostra

A ponta da pipeta foi trocada antes da inoculação de cada placa; o tampão inoculado foi misturado a cada 10 placas; e a ordem de plaqueamento de cada placa Neogen® Petrifilm® e das placas de PCA foi randomizada. A Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos, 5 alíquotas de 1mL de amostra foram adicionadas a 10 placas para cada uma das três combinações de tampão/temperatura listadas na Tabela 1 por três analistas. Para as placas de ágar, 1 alíquotas de 1mL de amostra foram adicionadas a 10 placas de Petri por três analistas. Dentro de 15 minutos, aproximadamente 12–15mL de PCA, temperado em um banho-maria ajustado a 45°C ± 1°C por 1–3 horas, foi adicionado e as amostras foram misturadas por rotação alternada e movimento de vai-e-vem das placas. Duas abordagens diferentes foram usadas para adicionar o ágar às placas: ou o ágar foi adicionado às placas enquanto estavam em uma única camada na bancada do laboratório (não empilhadas) ou enquanto as placas estavam empilhadas em grupos de seis. Veja a Figura 1 para um diagrama detalhado do estudo.

Incubação

As placas PCA foram mantidas à temperatura ambiente para permitir que o ágar solidificasse, depois incubadas em pilhas de no máximo seis placas. As Placas Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos foram incubadas em pilhas de no máximo 20 placas. As placas foram incubadas na temperatura indicada na Tabela 1.

Enumeração e Dados

No final do período de incubação apropriado, as Placas Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos e as placas de ágar foram removidas da incubadora e enumeradas manualmente. As unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram determinadas para todos os métodos. Desvio padrão, teste de diferença significativa (valor P), coeficiente de variação foram calculados e gráficos individuais das contagens brutas foram preparados (Figuras 2–4, Tabelas 2–3) para cada combinação de diluente/temperatura.

Resultados e discussão

Este estudo comparou Placas Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos com uma variedade de placas PCA ao focar na consistência dos resultados dos testes. Três diluentes diferentes foram pareados com a temperatura mais apropriada onde esses diluentes são tipicamente incubados — Solução Salina peptonada/30°C, Tampão de Butterfield/32°C e Água Peptonada Tamponada/35°C. Cada marca de PCA foi avaliada após adicionar ágar temperado às amostras em uma única camada de placas, bem como em pilhas de seis. Ao revisar os desvios padrão para a Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos em comparação com os ágar A, B e C, os desvios padrão para as Placas Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos foram equivalentes ou os mais baixos para todas as temperaturas, diluentes e procedimentos de empilhamento. O desvio padrão da Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos foi significativamente menor ($P < 0,05$) do que o do ágar B para todas as combinações de diluente/temperatura/empilhamento. Com exceção da não empilhada a 32°C usando a Tampão de Butterfield, o desvio padrão do ágar A foi estatisticamente equivalente ao das Placas Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos. Com exceção do Solução Salina peptonada/30°C/não empilhado, o ágar C teve um desvio padrão significativamente maior do que a Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos.

Ao avaliar o coeficiente de variação (CV), as Placas Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos resultaram na menor porcentagem em comparação com a SMA. Para a Solução Salina peptonada/30°C, o CV foi de 11,15% (ágar: 11,46% a 21,12%); para a Tampão de Butterfield/32°C, o CV foi de 9,70% (ágar: 12,10% a 16,98%); e para a água peptonada tamponada/35°C, o CV foi de 10,43% (ágar: 11,80% a 17,73%).

As Figuras 2-4 mostram como as Placas Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos são capazes de fornecer resultados mais consistentes em comparação com as marcas de PCA avaliadas. Os resultados das Placas Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos são claramente agrupados, enquanto os resultados dos ágar A, B e C são mais dispersos. Isso é importante para os laboratórios de testes de alimentos, pois a maioria participa de testes de proficiência e controles diários de processos. Eles querem poder comprovar aos seus clientes que os métodos que selecionaram para o laboratório fornecerão resultados consistentes e precisos. Como o setor de alimentos continua a crescer, com uma projeção de se tornar um setor de US\$ 1,6 bilhão até 2020,⁶ os laboratórios precisarão poder confiar nos métodos escolhidos para acompanhar as demandas e satisfazer seus clientes. Em última análise, fornecer a um laboratório um método de contagem de aeróbios mesófilos capaz de fornecer resultados consistentes lhes dá confiança em suas decisões de liberar ou reter o produto.

Embora não tenha havido diferenças significativas entre as placas de PCA que foram empilhadas durante o plaqueamento em comparação com as que foram colocadas em uma única camada neste estudo, o desempenho do método de Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos é melhor em comparação com os métodos de placa de ágar (Tabelas 2-3). É possível que, com um conjunto de dados maior, houvesse uma diferenciação clara entre os métodos de preparação para a SMA.

Este estudo, em geral, forneceu dados que demonstram que o método Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos fornece resultados mais consistentes quando usado nas condições comuns de incubação.

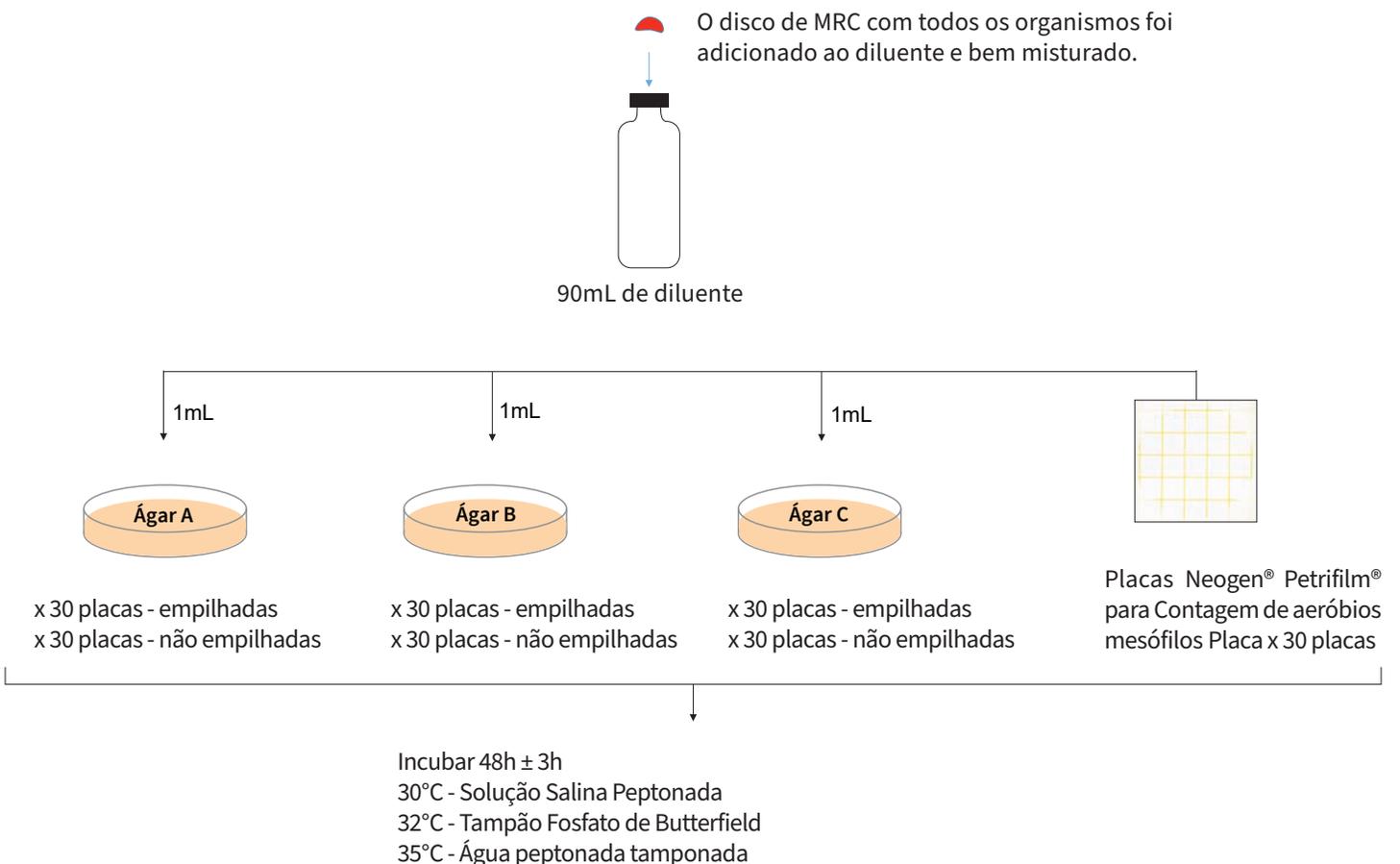


Figura 2a.

Figuras 2a e 2b Gráfico de dispersão comparando as contagens dos ágar A, B e C com a Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos após o plaqueamento das culturas com solução salina peptonada e incubação a 30°C. As placas foram empilhadas durante o despejo do ágar ou em uma única camada na bancada do laboratório (não empilhadas).

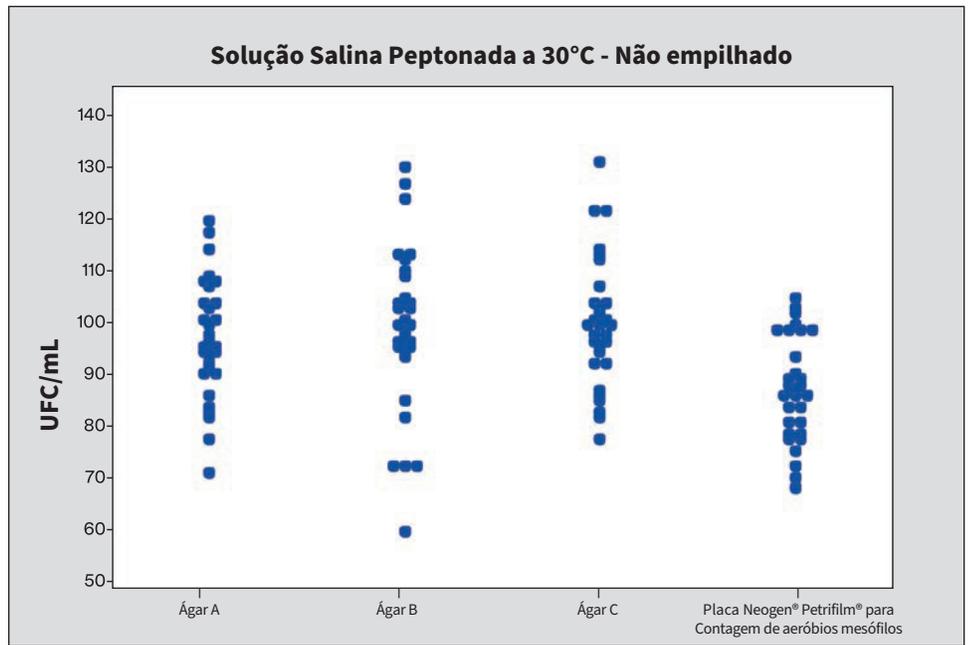


Figura 2b.

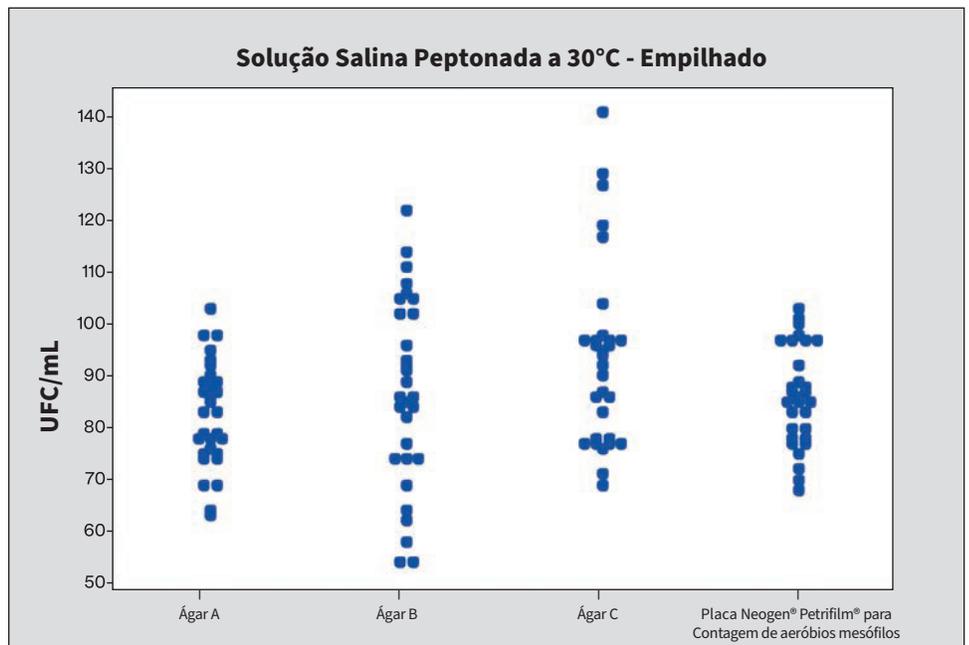


Figura 3a.

Figuras 3a e 3b Gráfico de dispersão comparando as contagens dos ágar A, B e C com a Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos após o plaqueamento das culturas com Tampão Fosfato de Butterfield e incubação a 32°C. As placas foram empilhadas durante o despejo do ágar ou em uma única camada na bancada do laboratório (não empilhadas).

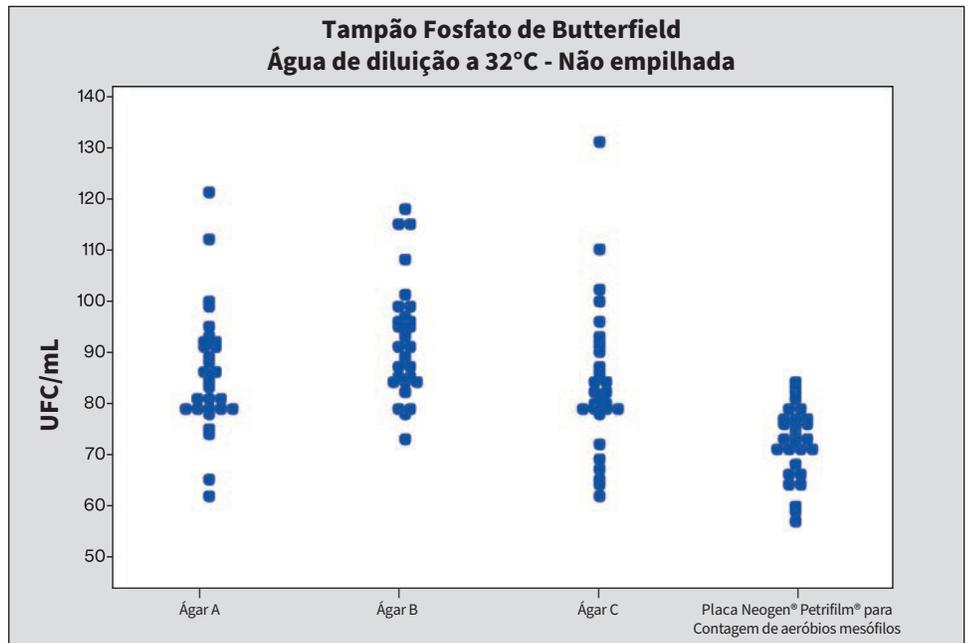


Figura 3b.

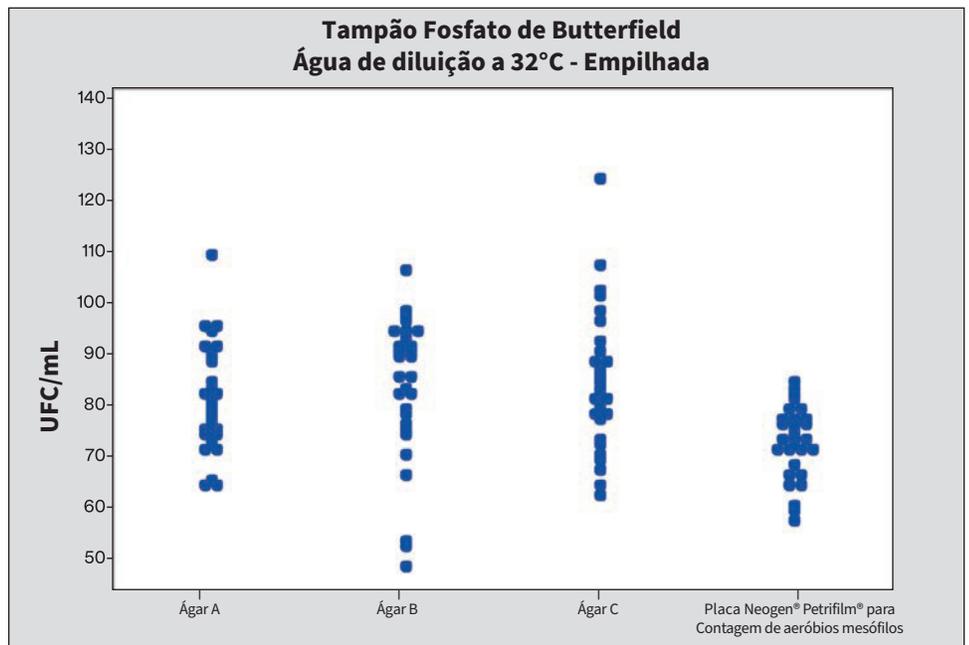


Figura 4a.

Figuras 4a e 4b Gráfico de dispersão comparando as contagens dos ágar A, B e C com a Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos após o plaqueamento das culturas com água peptonada tamponada e incubação a 35°C. As placas foram empilhadas durante o despejo do ágar ou em uma única camada na bancada do laboratório (não empilhadas).

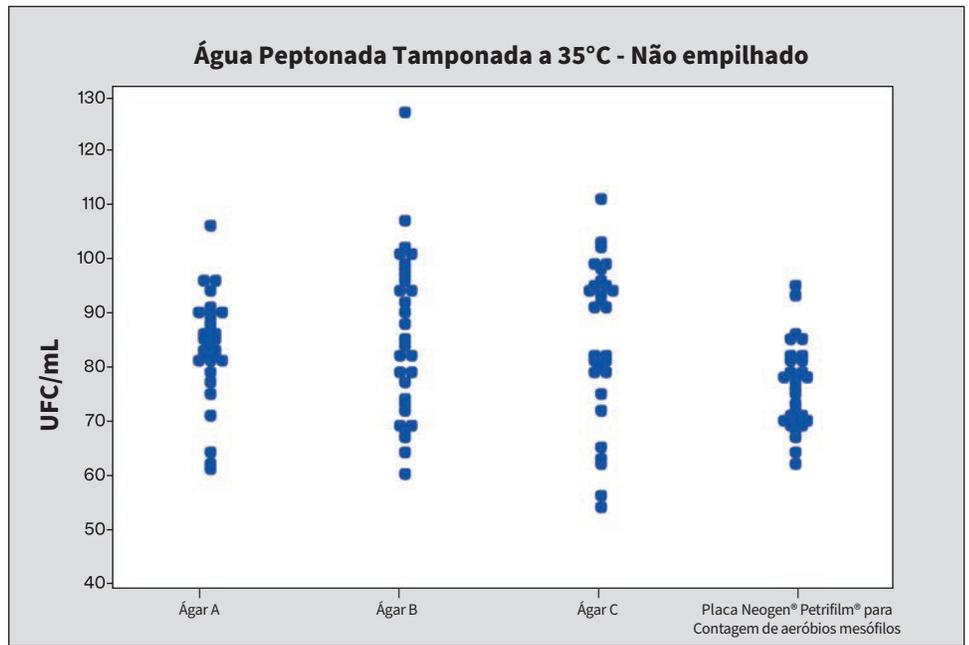


Figura 4b.

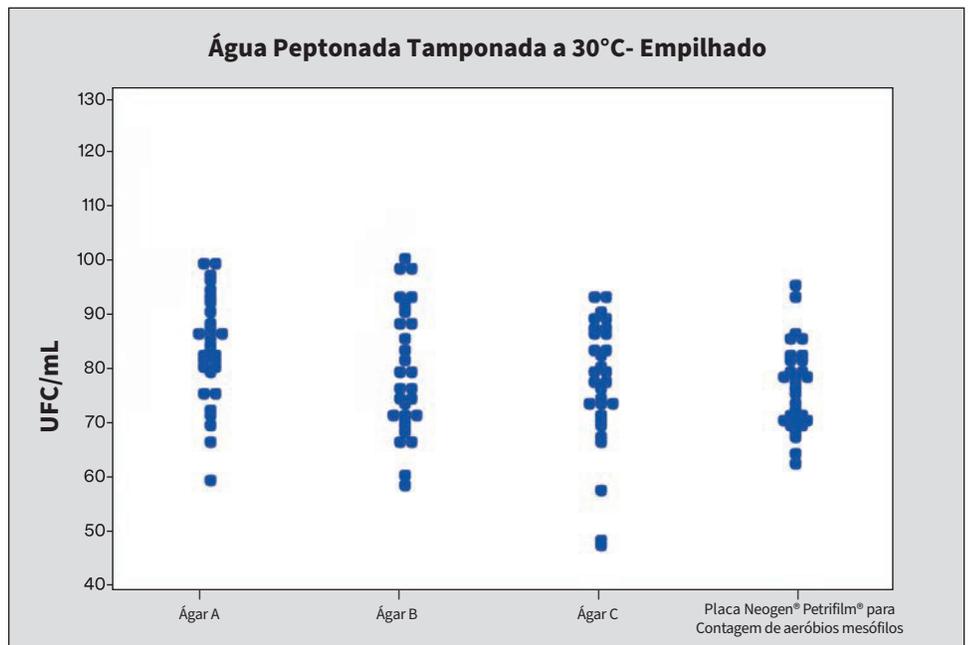


Tabela 2. Análise Estatística do Método - Placas PCA não empilhadas.

Desvio padrão - não empilhado			
Método padrão	Solução Salina Peptonada a 30°C	Tampão Fosfato de Butterfield a 32°C	Água Peptona Tamponada a 35°C
Ágar A	11	12*	10
Ágar B	15*	11*	15*
Ágar C	12	14*	15*
Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos	10	7	8

Coeficiente de variação percentual (%CV) - Não empilhado			
Método padrão	Solução Salina Peptonada a 30°C	Tampão Fosfato de Butterfield a 32°C	Água Peptona Tamponada a 35°C
Ágar A	11.46%	14.02%	11.88%
Ágar B	15.78%	12.10%	17.73%
Ágar C	12.02%	16.98%	17.18%
Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos	11.15%	9.70%	10.43%

*Diferença estatisticamente significativa em comparação com as Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos

Tabela 3. Análise estatística dos métodos após placas de Ágar de Métodos Padrão serem empilhadas durante o plaqueamento.

Desvio padrão - Não empilhado			
Método padrão	Solução Salina Peptonada a 30°C	Tampão Fosfato de Butterfield a 32°C	Água Peptona Tamponada a 35°C
Ágar A	10	10	10
Ágar B	18*	14*	12*
Ágar C	18*	13*	12*
Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos	10	7	8

Coeficiente de variação percentual (%CV) - Não empilhado			
Método padrão	Solução Salina Peptonada a 30°C	Tampão Fosfato de Butterfield a 32°C	Água Peptona Tamponada a 35°C
Ágar A	12.23%	12.92%	11.80%
Ágar B	21.12%	16.95%	14.69%
Ágar C	19.13%	16.02%	15.31%
Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos	11.15%	9.70%	10.43%

*Diferença estatisticamente significativa em comparação com as Placa Neogen® Petrifilm® para Contagem de aeróbios mesófilos

Referências

1. US FDA Bacteriological Analytical Manual, Chapter 3: Aerobic Plate Count. Authors: Larry Maturin and James T. Peeler. January 2001. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>
2. USDA Microbiology Laboratory Guidebook, MLG 3.01: Quantitative Analysis of Bacteria in Foods as Sanitary Indicators. Effective Date: 01/20/11. http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/03f8ce1e-b7e7-4257-8047-dcd215d0ae49/MLG_3_01.pdf?MOD=AJPERES
3. Aerobic Plate Count, Murray-Brown Laboratories, Inc., <http://mb-labs.com/resources/aerobic-plate-count/>
4. Stack-Pouring of Petri Plates: A Potential Source of Error, J. of Food Protection, Vol. 43, No. 7, Pages 561-562 (July 1980).
5. 3M™ Petrifilm™ Aerobic Count Plate 6400/6406 Product Instructions. © 3M 2011. 34-8704-9516-4.
6. <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/food-safety-testing-market.asp>