

# Interpretação Microbiana Manual vs. Automatizada utilizando a Leitora Avançada de Placas Neogen® Petrifilm®

## Visão geral

Contar visualmente as colônias em uma placa é uma tarefa demorada, o que tornou os contadores automáticos de placas uma ferramenta valiosa em um laboratório de microbiologia. A Neogen® Petrifilm® Leitora Avançada de Placas automatiza a enumeração de dez tipos de Placas Neogen® Petrifilm® e mais o Neogen® Petrifilm® Disco STX Staph Express para auxiliar analistas de laboratório durante a execução desta tarefa.

O estudo a seguir foi realizado para demonstrar a acurácia da Leitora Avançada de Placas Neogen® Petrifilm® em comparação com os resultados obtidos pela contagem manual. As seguintes Placas Neogen® Petrifilm® foram avaliadas: Placa para contagem de *E. coli*/ coliformes (EC/CC), Placa para contagem Rápida de *E. coli*/ coliformes (REC), Placa para contagem de coliformes (CC), Placa para contagem seletiva de *E. coli* (SEC), Placa para contagem de estafilococos (STX), Disco de estafilococos (Disco STX), Placa para contagem de *Enterobacteriaceae* (EB), Placa para contagem de aeróbios mesófilos (AC) e Placa para contagem rápida de aeróbios mesófilos (RAC).

## Métodos

### Estudo de Diluente

As cepas puras de culturas de bactérias foram isoladas de culturas estoque compradas ou culturas estoque congeladas da Neogen®. Cada cepa foi subcultivada em um caldo não seletivo e incubada por 18 - 24 horas antes de diluir a cultura em cada um dos diluentes que está listado nas Instruções do Produto correspondente. Diferentes concentrações de cada um dos organismos listados na Tabela 1 foram obtidas a fim de obter populações nos níveis baixo, médio e alto de cada faixa de contagem da Placa Neogen® Petrifilm® (por exemplo, o alvo em UFC/mL para uma placa com uma faixa de contagem de 0-300 foi de 0-75 (baixo), 75-175 (médio) e 175-300 (alto)). Um mililitro (mL) de cada diluição foi adicionado às Placas Neogen® Petrifilm® correspondentes com base na Tabela 1. As Placas Neogen® Petrifilm® foram incubadas de acordo com as respectivas instruções de uso. Após a incubação, as Placas Neogen® Petrifilm® foram alimentadas na Neogen® Petrifilm® Leitora Avançada de Placas e subsequentemente foram contadas manualmente por um microbiologista para obter a contagem de colônias para comparação.

**Tabela 1.** Organismos utilizados para cada Placa Neogen® Petrifilm®

Organismos	Placa Neogen® Petrifilm®
<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372	STX, disco STX, RAC
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	AC, RAC
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864	REC, SEC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	EC/CC, REC, CC, EB, RAC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	REC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 14506	EB
<i>Enterobacter amnigenus</i> ATCC 51816	EC/CC, REC, CC, EB
<i>Enterobacter amnigenus</i> ATCC 51818	EC/CC, REC, CC, EB
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	EC/CC, SEC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	EC/CC, CC, SEC, STX, disco STX, EB, AC, RAC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 51813	EC/CC, CC, SEC, AC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	REC, CC, SEC, EB, AC, RAC
<i>Escherichia coli</i> 3M-FR8	SEC
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13216	REC, SEC
<i>Escherichia coli</i> REC1	REC, SEC
<i>Espécie Flavobacterium</i> ATCC 51823	AC
<i>Hafnia alvei</i> ATCC 51815	EC/CC, CC

Organismos	Placa Neogen® Petrifilm®
<i>Korcuria varians</i> ATCC 51820	AC
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 51817	EC/CC, REC, CC
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 19257	AC, RAC
<i>Microbacterium testaceum</i> ATCC 15829	AC
<i>Espécie Micrococcus</i> ATCC 51819	AC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	EC/CC, CC, RAC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 35554	EB
<i>Pseudomonas spp</i> ATCC 51821	AC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIMB 12469	RAC
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 51812	EC/CC, REC, CC, EB
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	EB
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	STX, disco STX, AC, RAC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 49476	STX, disco STX
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	STX, disco STX, AC, RAC
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	STX, disco STX
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	STX, disco STX
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 27965	AC

## Estudo de matrizes de alimentos

Todos os alimentos foram selecionados antes do início do estudo. Os alimentos que continham um nível suficiente de flora acompanhante para cobrir as faixas contáveis baixa, média e alta das Placas Neogen® Petrifilm® não foram artificialmente contaminados. Os alimentos que não continham um nível suficiente de flora acompanhante foram inoculados com cepas de bactérias. As culturas foram isoladas de estoques de cultura compradas ou culturas de estoque congeladas da Neogen®. Cada cepa foi subcultivada em um caldo não seletivo e incubada por 18 – 24 horas antes de diluir a cultura para cada nível apropriado. Diferentes concentrações de cada um dos organismos listados na Tabela 3 foram adicionadas aos alimentos listados na Tabela 2. Cada matriz de alimentos foi diluída em 1:10, 1:100 e 1:1000 e inoculada para atingir as faixas contáveis baixo, médio e alto para contagem na Placa Neogen® Petrifilm®. Um mililitro (mL) de cada diluição foi adicionado às Placas Neogen® Petrifilm® correspondentes com base nas Tabelas 2 e 3. As Placas Neogen® Petrifilm® foram incubadas de acordo com as respectivas instruções de uso. Após a incubação, as Placas Neogen® Petrifilm® foram alimentadas na Neogen® Petrifilm® Leitora Avançada de Placas e subsequentemente foram contadas manualmente por um microbiologista para obter a contagem de colônias para comparação.

**Tabela 2.** Alimentos testados para cada Placa Neogen® Petrifilm®

<b>Matriz de alimentos</b>	<b>Placa Neogen® Petrifilm®</b>
<b>Carne moída bovina crua</b>	EC/CC, REC, CC, SEC, EB
<b>Leite cru</b>	EC/CC, REC, CC, SEC, STX, disco STX, AC, RAC
<b>Coco</b>	EC/CC, REC, CC, SEC, EB
<b>Frango cru</b>	EC/CC, REC, CC, SEC, EB
<b>Sorvete</b>	EC/CC, REC, CC, SEC
<b>Hummus de pimenta vermelha</b>	EC/CC, REC, CC, SEC
<b>Brotos de alfafa</b>	EC/CC, REC, CC
<b>Miúdos</b>	SEC
<b>Salsicha Crua</b>	STX, disco STX
<b>Ovo líquido</b>	STX, disco STX, EB
<b>Bolo de chocolate com recheio de creme</b>	STX, disco STX
<b>Salada de batata</b>	STX, disco STX
<b>Bolinhos de vegetais congelados</b>	STX, disco STX
<b>Nuggets de frango</b>	EB
<b>Achocolatado</b>	EB
<b>Pizza suprema congelada</b>	EB
<b>Creme de leite</b>	AC, RAC
<b>Atum albacora</b>	AC, RAC
<b>Soro de leite em pó</b>	AC, RAC
<b>Queijo pasteurizado</b>	AC, RAC
<b>Refeição de espaguete congelada</b>	AC, RAC
<b>Espinafre congelado</b>	AC, RAC
<b>Patê de Presunto Processado</b>	AC, RAC
<b>Carne de peru moída</b>	RAC
<b>Sopa de tomate</b>	RAC
<b>Biscoitos recheados de chocolate</b>	RAC

**Tabela 3.** Organismos usados para inocular alimentos para cada Placa Neogen® Petrifilm®

<b>Organismos</b>	<b>Placa Neogen® Petrifilm®</b>
<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372	STX, disco STX
<i>Enterobacter amnigenus</i> ATCC 51818	EC/CC, REC, CC, SEC, EB
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	EC/CC, REC, CC, SEC, AC, RAC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 51813	EC/CC, REC, CC, SEC
<i>Hafnia alvei</i> ATCC 51815	EB
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 51817	REC, SEC
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	RAC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	AC, RAC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 35554	EB
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 51812	EC/CC, REC, CC, SEC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	STX, disco STX, AC, RAC
<i>Staphylococcus cohnii</i> ATCC 35662	STX, disco STX
<i>Shigella sonnei</i> U8	EC/CC, REC, CC, SEC, EB

Os dados dos estudos com diferentes diluentes e com diferentes alimentos foram analisados com base nas três afirmações abaixo, usando Placas Neogen® Petrifilm® dentro da faixa contável, conforme descrito nas Instruções do Produto. A porcentagem de placas Neogen® Petrifilm® que atenderam a esses critérios é exibida na Tabela 4 e na Tabela 5 para o estudo de diluentes e estudo de alimentos, respectivamente.

1. O valor em log da contagem realizada pela Leitora está dentro de  $\pm 10\%$  do valor em log da contagem humana, assumindo que a placa tem mais de 10 colônias.
2. O número total de falsos positivos e falsos negativos não pode exceder 10% do valor em log da contagem humana.
3. A diferença entre a contagem de humanos e Leitoras não pode exceder 2 colônias para placas contendo 0-10 colônias, incluindo 2 falsos positivos e falsos negativos totais.

## Resultados - Estudo de Diluentes

No total, 11 diluentes foram testados, resultando em 1.705 placas testadas entre os 8 tipos de Placas Neogen® Petrifilm® mais o Neogen® Petrifilm® Disco STX Staph Express. A porcentagem de placas para as quais a Leitora Avançada de Placas Neogen® Petrifilm® atendeu aos critérios descritos está resumida na Tabela 4.

**Tabela 4.** Porcentagem das contagens da Leitora Avançada de Placas Neogen® Petrifilm® que atenderam aos critérios para os estudos de diluentes.

Método	Tipos de colônias contados	Resultado da Placa Neogen® Petrifilm®	# de placas	Precisão para Leitora #1 (%)	Precisão para Leitora #2 (%)
EC/CC	1. Vermelho com gás e azul com gás	Contagem total de coliformes	156	96	97
	2. Azul com gás	Contagem total de <i>E. coli</i>		99	99
	3. Azul com e sem gás	N/A		100	99
REC	1. Todas as colônias vermelhas com gás e todas as colônias azuis	Contagem total de coliformes (Método FDA - BAM)	165	100	99
REC	2. Todas as colônias vermelhas e todas as colônias azuis com ou sem gás	Contagem total de coliformes	165	100	100
	3. Todas as colônias azuis	Contagem total de <i>E. coli</i>			
CC	1. Todas as colônias vermelhas com gás	Contagem total de coliformes (Método FDA - BAM)	165	98	100
	2. Todas as colônias vermelhas sem gás	Contagem total de coliformes		98	100
SEC	Todas as colônias azul-esverdeadas	Contagem total de <i>E. coli</i>	186	99	98
STX	Todas as colônias vermelho-violeta	Contagem total de <i>S. aureus</i>	104	100	100
Disco STX	Todas as zonas rosas	Contagem total de <i>S. aureus</i>	101	97	100
EB	Todas as colônias vermelhas produzindo ácido e/ ou gás	Contagem total de <i>Enterobacteriaceae</i>	181	100	99
AC	Todas as colônias	Contagem total de aeróbios mesófilos	272	97	96
RAC	Todas as colônias	Contagem total de aeróbios mesófilos	210	94	97

## Resultados - Estudo de matrizes de alimentos

No total, 26 alimentos foram testados, resultando em 1.503 placas testadas nas 8 Placas Neogen® Petrifilm® mais o Neogen® Petrifilm® Disco STX Staph Express. A porcentagem de placas para as quais a Leitora Avançada de Placas Neogen® Petrifilm® atendeu aos critérios descritos está resumida na Tabela 5.

**Tabela 5.** Porcentagem das contagens da Leitora Avançada de Placas Neogen® Petrifilm® que atendem aos critérios após os estudos de alimentos.

Método	Tipos de colônias contados	Resultado da Placa Neogen® Petrifilm®	# de placas	Precisão para Leitora #1 (%)	Precisão para Leitora #2 (%)
EC/CC	1. Vermelho com gás e azul com gás	Contagem total de coliformes	195	98	98
	2. Azul com gás	Contagem total de <i>E. coli</i>		96	96
	3. Azul com e sem gás	N/A		97	95
REC	1. Todas as colônias vermelhas com gás e todas as colônias azuis	Contagem total de coliformes (Método FDA - BAM)	123	98	99
REC	2. Todas as colônias vermelhas e todas as colônias azuis com ou sem gás	Contagem total de coliformes	123	96	96
	3. Todas as colônias azuis	Contagem total de <i>E. coli</i>		98	99
CC	1. Todas as colônias vermelhas com gás	Contagem total de coliformes (Método FDA - BAM)	126	98	99
	2. Todas as colônias vermelhas sem gás	Contagem total de coliformes		98	98
SEC	Todas as colônias azul-esverdeadas	Contagem total de <i>E. coli</i>	151	97	93
STX	Todas as colônias vermelho-violeta	Contagem total de <i>S. aureus</i>	149	97	95
Disco STX	Todas as zonas rosas	Contagem total de <i>S. aureus</i>	154	95	90
EB	Todas as colônias vermelhas produzindo ácido e/ ou gás	Contagem total de <i>Enterobacteriaceae</i>	140	96	93
AC	Todas as colônias	Contagem total de aeróbios mesófilos	204	95	93
RAC	Todas as colônias	Contagem total de aeróbios mesófilos	261	95	96

## Conclusão

Das Placas Neogen® Petrifilm® que foram testadas com 7 a 13 isolados diferentes no estudo dos diluentes, todos eles alcançaram uma precisão de pelo menos 94% na Leitora 1 e 96% na Leitora 2. Da mesma forma, as Placas Neogen® Petrifilm® que foram testadas em 6-8 matrizes alimentares representativas alcançaram uma precisão de pelo menos 95% na Leitora 1 e 90% na Leitora 2.

**Brasil**

✉ [infobr@neogen.com](mailto:infobr@neogen.com) ☎ +55 19 3935 3727

