



## **NOTA INFORMATIVA**

### **ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MATRIZ EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA DEL LABORATORIO ARBITRAL AGROALIMENTARIO**

En esta nota informativa se describe la metodología que ha seguido el departamento de microbiología para estimar la incertidumbre de matriz para los distintos tipos de matriz que suele analizar y los resultados obtenidos.

#### **1.- Introducción**

En noviembre de 2019 se publicó una nueva revisión de la norma ISO 19036 para la estimación de la incertidumbre en los ensayos microbiológicos de los productos de la cadena alimentaria. ISO 19036:2019 Microbiology of the food chain – Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.

En esta nueva versión se describen tres tipos de contribuciones a la incertidumbre:

- a) incertidumbre técnica
- b) incertidumbre de matriz
- c) incertidumbre de distribución.

La incertidumbre técnica corresponde a la desviación estándar de reproducibilidad ( $s_R$ ), la cual depende del método utilizado y del propio laboratorio. Debido a ello cada laboratorio debe obtenerla experimentalmente en la validación del método.

La incertidumbre de distribución incluye: la incertidumbre de Poisson, la incertidumbre de confirmación y la incertidumbre de NMP, que se obtienen matemáticamente y se aplicarán en función de la técnica utilizada en el análisis.

La incertidumbre de matriz hace referencia a la variación entre los resultados de diferentes porciones de ensayo tomadas a partir de una misma muestra de laboratorio y refleja el hecho de que cada porción de análisis no sea representativa del total de la muestra de laboratorio. Esta incertidumbre ha de obtenerse experimentalmente.

De forma contraria a la incertidumbre técnica, la incertidumbre de matriz se considera independiente del método de análisis y del microorganismo analizado.

En el apartado 6.4 de la norma ISO 19036:2019 se permite a un laboratorio utilizar los valores de incertidumbre de matriz obtenidos por otro laboratorio si espera que sus muestras tengan una incertidumbre de matriz similar.

El valor de la incertidumbre de matriz va a depender principalmente de la homogeneidad de la matriz que se analice, de forma que en matrices muy homogéneas el valor de esta componente sea pequeño y más alto en productos sólidos y matrices formadas por múltiples componentes; por lo que este valor debe estimarse para cada tipo de matriz.

## 2.- Metodología

El primer paso para estimar la incertidumbre de matriz es clasificar las matrices que normalmente analiza el laboratorio en diferentes tipos.

Según las muestras recibidas en este departamento se han clasificado las matrices en los siguientes tipos:

- i. Líquidos: zumo, leche.
- ii. Polvo: harina de cereales, harina de pescado, harina de carne (sólidos fácilmente homogeneizables).
- iii. Sólidos pequeños: pienso, pellets, (la porción de análisis de 10 g contiene varias unidades).
- iv. Sólidos grandes homogéneos: carne, queso, pescado, masticables para mascotas (la porción de análisis de 10 g solo contiene una unidad o un trozo de esta).
- v. Sólidos heterogéneos: alimentos formados por varios componentes.

Es recomendable usar matrices contaminadas de forma natural, ya que es poco probable que la contaminación artificial refleje la incertidumbre de matriz real. Sin embargo, se ha hecho una excepción con el tipo de matriz líquidos (i) debido a su facilidad de homogeneización. Para ello se contaminaron 100 ml de caldo de pollo con una bacteria Gram positiva (*Staphylococcus aureus* – CECT 435) y una Gram negativa (*Escherichia coli* – CECT 434) y se homogeneizó por agitación vigorosa.

Aunque la norma permite usar el valor de  $s_m=0.1$  (log10) para este tipo de matriz muy homogénea el laboratorio prefirió estimarla.

Para el resto de tipos de matrices se ha escogido:

ii Harina de pescado



Fig. 1. Harina de pescado (10 g)

iii Pienso para mascotas



Fig. 2. Pienso para mascotas (10 g)

iv Pescado



Fig. 3. Trucha de aproximadamente 300 g

v Ensalada



Fig. 4. Ensalada lista para el consumo



Como la incertidumbre de matriz es independiente del método para determinarla se ha elegido un método sencillo, sin confirmación y con el que se determine un microorganismo que es probable que esté de forma natural en las matrices analizadas. Se ha escogido el método de recuento de colonias a 30 °C mediante la técnica de siembra en profundidad (ISO 4833-1:2013). La siembra y recuento se realizan por duplicado en medio PCA (Oxoid, CM0463) en dos diluciones sucesivas. Como diluyente se utiliza APT (Oxoid, CM1049). Por tanto el cálculo del recuento se determina sobre cuatro placas.

El análisis debe llevarse a cabo en condiciones de repetibilidad (Figura 5) para evitar que otras componentes correspondientes a la incertidumbre técnica conlleven a una sobreestimación de la incertidumbre de matriz.

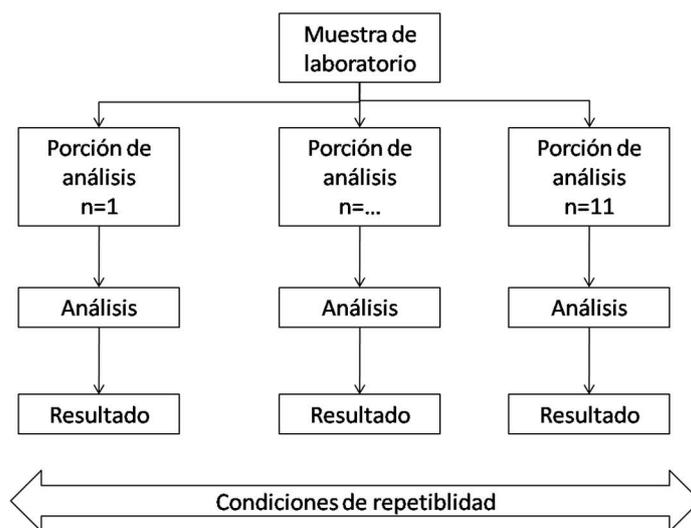


Fig.5. Esquema de trabajo

Aunque las condiciones de repetibilidad implican no variar ninguna condición durante el análisis, es posible que operadores diferentes realicen etapas distintas siempre que sea el mismo operador el que realice la misma etapa para todas las porciones de análisis, por lo que se procedió de este modo.

Otro aspecto a tener en cuenta en las condiciones de repetibilidad es el tiempo que transcurre entre la preparación de la dilución inicial y el vertido del medio de cultivo, el cual debe ser lo más similar posible en todos los análisis para evitar que la multiplicación de los microorganismos pueda afectar a los resultados.

De forma previa al análisis, se analizó una porción de cada muestra para conocer aproximadamente el nivel de contaminación de la misma y concretar el número de diluciones necesarias para su recuento. Posteriormente, para cada muestra se analizaron 11 porciones de análisis de 10 gramos de la misma muestra de laboratorio (i, ii, iii, iv, v) previa homogeneización según se indica en el apartado 6.3 de la norma ISO 19036.

Para poder tener en cuenta un resultado tras la incubación y recuento del número de colonias de las placas, este debe cumplir el requisito de que la suma de colonias contadas utilizadas para el cálculo del recuento ( $\Sigma C$ ) debe ser de al menos de 30 ufc.

La incertidumbre de matriz se calcula como la desviación estándar de reproducibilidad (fórmula DESVEST en Excel®) de los resultados obtenidos expresados como logaritmo decimal.

Todos los análisis se realizaron bajo las condiciones de la norma UNE-EN ISO 17025:2017



### 3.- Resultados

Los resultados obtenidos para cada una de las matrices analizadas se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 1. Matriz tipo i

Matriz:		Líquido (i)				n=11	$s_m =$	0,0427
		Caldo de pollo						
Porción de análisis	Factores de dilución (d)				Total colonias contadas	Resultado (ufc/g)	Resultado (log)	
	Colonias contadas (C)							
	$d_A$	$C_A$	$d_B$	$C_B$	$\Sigma C$			
i-1	3	88	3	73	180	8,18E+04	4,9128	
	4	11	4	8				
i-2	3	95	3	87	203	9,23E+04	4,9651	
	4	8	4	13				
i-3	3	106	3	77	204	9,27E+04	4,9672	
	4	12	4	9				
i-4	3	96	3	89	202	9,18E+04	4,9629	
	4	6	4	11				
i-5	3	80	3	69	163	7,41E+04	4,8698	
	4	7	4	7				
i-6	3	92	3	90	198	9,00E+04	4,9542	
	4	9	4	7				
i-7	3	102	3	87	209	9,50E+04	4,9777	
	4	10	4	10				
i-8	3	79	3	71	174	7,91E+04	4,8981	
	4	14	4	10				
i-9	3	76	3	87	176	8,00E+04	4,9031	
	4	9	4	4				
i-10	3	103	3	79	198	9,00E+04	4,9542	
	4	7	4	9				
i-11	3	76	3	67	158	7,18E+04	4,8562	
	4	9	4	6				



Tabla 2. Matriz tipo ii

Matriz:		Polvo/molido (ii)				n=11	s <sub>m</sub> =	0,1209
		Harina de pescado						
Porción de análisis	Factores de dilución (d)				Total colonias contadas	Resultado (ufc/g)	Resultado (log)	
	Colonias contadas (C)							
	d <sub>A</sub>	C <sub>A</sub>	d <sub>B</sub>	C <sub>B</sub>	ΣC			
ii-1	1	199	1	191	424	1,93E+03	3,2849	
	2	15	2	19				
ii-2	1	176	1	173	380	1,73E+03	3,2374	
	2	18	2	13				
ii-3	1	179	1	160	382	1,74E+03	3,2396	
	2	19	2	24				
ii-4	1	198	1	188	439	2,00E+03	3,3000	
	2	22	2	31				
ii-5	1	155	1	169	385	1,75E+03	3,2430	
	2	30	2	31				
ii-6	1	200	1	174	410	1,86E+03	3,2704	
	2	19	2	17				
ii-7	1	186	1	166	393	1,79E+03	3,2520	
	2	21	2	20				
ii-8	2	42	2	37	89	4,05E+03	3,6070	
	3	6	3	4				
ii-9	1	230	1	184	462	2,10E+03	3,3222	
	2	24	2	24				
ii-10	1	207	1	209	448	2,04E+03	3,3089	
	2	14	2	18				
ii-11	1	334	1	315	712	3,24E+03	3,5101	
	2	34	2	29				



Tabla 3. Matriz tipo iii

Matriz:		Sólido pequeño (iii)				n=11	s <sub>m</sub> =	0,2075
		Pienso mascotas						
Porción de análisis	Factores de dilución (d)				Total colonias contadas	Resultado (ufc/g)	Resultado (log)	
	Colonias contadas (C)							
	d <sub>A</sub>	C <sub>A</sub>	d <sub>B</sub>	C <sub>B</sub>	ΣC			
iii-1	2	300	2	271	621	2,82E+04	4,4507	
	3	23	3	27				
iii-2	2	303	2	265	611	2,78E+04	4,4436	
	3	20	3	23				
iii-3	3	46	3	40	94	4,27E+04	4,6307	
	4	5	4	3				
iii-4	3	42	3	38	88	4,00E+04	4,6021	
	4	4	4	4				
iii-5	3	134	3	113	282	1,28E+05	5,1078	
	4	15	4	20				
iii-6	2	248	2	202	495	2,25E+04	4,3522	
	3	27	3	18				
iii-7	3	36	3	36	80	3,64E+04	4,5607	
	4	4	4	4				
iii-8	2	311	2	263	620	2,82E+04	4,4500	
	3	25	3	21				
iii-9	3	57	3	51	120	5,45E+04	4,7368	
	4	6	4	6				
iii-10	3	32	3	36	77	3,50E+04	4,5441	
	4	3	4	6				
iii-11	3	56	3	53	119	5,41E+04	4,7331	
	4	5	4	5				



Tabla 4. Matriz tipo iv

Matriz: Sólido grande (iv)		Pescado (trucha)				n=11	$s_m=$ 0,3475	
Porción de análisis	Factores de dilución (d) Colonias contadas (C)				Total colonias contadas	Resultado (ufc/g)	Resultado (log)	
	$d_A$	$C_A$	$d_B$	$C_B$	$\Sigma C$			
iv-1	4	67	4	69	143	6,50E+05	5,8129	
	5	3	5	4				
iv-2	4	162	4	166	364	1,65E+06	6,2187	
	5	15	5	21				
iv-3	4	210	4	188	433	1,97E+06	6,2941	
	5	20	5	15				
iv-4	4	214	4	196	458	2,08E+06	6,3184	
	5	26	5	22				
iv-5	4	158	4	126	304	1,38E+06	6,1405	
	5	10	5	10				
iv-6	4	321	4	276	675	3,07E+06	6,4869	
	5	39	5	39				
iv-7	4	314	4	311	681	3,10E+06	6,4907	
	5	21	5	35				
iv-8	5	55	5	55	124	5,64E+06	6,7510	
	6	5	6	9				
iv-9	5	100	5	112	231	1,05E+07	7,0212	
	6	9	6	10				
iv-10	4	263	4	252	549	2,50E+06	6,3971	
	5	16	5	18				
iv-11	5	80	5	82	169	7,68E+06	6,8855	
	6	1	6	6				



Tabla 5. Matriz tipo v

Matriz:		Producto varios componentes (v)					
		Ensalada mixta LPC				n=11	s <sub>m</sub> = 0,3788
Porción de análisis	Factores de dilución (d)				Total colonias contadas	Resultado (ufc/g)	Resultado (log)
	Colonias contadas (C)						
	d <sub>A</sub>	C <sub>A</sub>	d <sub>B</sub>	C <sub>B</sub>	ΣC		
v-1	4	169	4	149	346	1,57E+06	6,1967
	5	13	5	15			
v-2	5	153	5	170	353	1,60E+07	7,2054
	6	15	6	15			
v-3	5	270	5	247	563	2,56E+07	7,4081
	6	23	6	23			
v-4	6	46	6	42	100	4,55E+07	7,6576
	7	7	7	5			
v-5	5	88	5	72	179	8,14E+06	6,9104
	6	9	6	10			
v-6	5	77	5	87	174	7,91E+06	6,8981
	6	6	6	4			
v-7	5	91	5	76	186	8,45E+06	6,9271
	6	6	6	13			
v-8	5	177	5	172	398	1,81E+07	7,2575
	6	26	6	23			
v-9	5	82	5	83	174	7,91E+06	6,8981
	6	4	6	5			
v-10	5	160	5	205	398	1,81E+07	7,2575
	6	13	6	20			
v-11	5	89	5	83	181	8,23E+06	6,9153
	6	5	6	4			



A partir de estos resultados se hallaron los valores de la incertidumbre de matriz para cada tipo de matriz (Tabla 6). Estos valores son los que el laboratorio aplicará para la componente de incertidumbre de matriz en la estimación de la incertidumbre expandida.

Tabla 6. Incertidumbre de matriz

Tipo	Forma física	Matriz	Sm (log10)
i	líquido	caldo de pollo	0,0427
ii	polvo/molido	harina de pescado	0,1209
iii	sólidos pequeños	pienso mascotas	0,2075
iv	sólidos grandes	pescado (trucha)	0,3475
v	varios componentes	ensalada mixta LPC	0,3788

#### 4.- Conclusión

El análisis de los datos obtenidos de la incertidumbre de matriz en los cinco grupos de matrices, pone de manifiesto, como era de esperar, que cuanto mayor es la heterogeneidad de las muestras y la dificultad de homogeneización de las mismas, mayor es la incertidumbre de matriz (Tabla 6).

#### 5.- Bibliografía

International Organization of Standardization. *ISO 19036:2019 Microbiology of the food chain – Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.*

Asociación Española de Normalización. *UNE-EN ISO 4833-1:2014 Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 1: Recuento de colonias a 30 ° C mediante la técnica de siembra en profundidad.*

Asociación Española de Normalización. *UNE-EN ISO 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.*

Asociación Española de Normalización. *UNE-EN ISO 6887:2017 Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico.*

Ah Soon C., Cornu M. Report of 2003/2004, *ISO Trials about uncertainty measurement*, June 2004, AFSSA, Maisons Alfort, France.