

COMUNICACIÓN CORTA

Evaluación del desempeño del método RIDA COUNT para la enumeración de bacterias en leche

Ailin Martínez Vasallo, Dayaimi González Reyes, Alejandra Villoch Cambas

Laboratorio Microbiología. CENLAC. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: ailin@censa.edu.cu

RESUMEN: El método de placas Rida Count es utilizado en el mundo con una confiabilidad demostrada, pero al ser introducido por primera vez en Cuba se realizó una comprobación de su funcionamiento. Se comparó con los métodos convencionales para la enumeración de bacterias totales, coliformes totales, enterobacterias, *Escherichia coli*, y *Salmonella* spp. acorde con la norma ISO/IEC 16140:2003 para el uso de métodos microbiológicos alternativos. Se contaminaron muestras de leche estéril reconstituida con inóculos de cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* entérica serotipo *typhimurium* (Laboratorio Control Microbiológico, CENSA) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). El coeficiente de correlación lineal de Rida Count para conteo de bacterias mesófilas, coliformes totales, *Escherichia coli*, enterobacterias y *Salmonella* spp. con relación a la técnica tradicional en leche estéril contaminada fue de 0.997, 0.999, 0.998, 0.996 y 0.997; en el caso de leche cruda fue de 0.998, 0.991, 0.994, 0.991 y 0.996, respectivamente. Los resultados experimentales y prácticos demostraron que el funcionamiento del método se encuentra acorde con lo descrito y constituye una alternativa conveniente para los laboratorios lácteos del país con escasez de recursos para la cuantificación de microorganismos, ya que reduce el tiempo y los recursos de trabajo en el laboratorio, brindando resultados entre 24-48 horas y aumento del rendimiento en un 95%.

Palabras clave: Rida Count, enumeración de microorganismos, método convencional.

Performance assessment of the RIDA COUNT method for the enumeration of bacteria in milk

ABSTRACT: The method of Rida Count plates is used in the world with a demonstrated reliability, but as being introduced for the first time in Cuba, a verification of its operation was carried out. For that reason, the method was compared with the conventional methods used for the enumeration of total bacteria, total coliforms, enterobacteria, *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp. in agreement with the standard ISO/IEC 16140:2003 for the use of alternative microbiological methods. Reconstituted sterile milk samples were inoculated with strains of *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (Laboratory of Microbiological Control, CENSA) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). The linear correlation coefficients of Rida Count for total count, total coliforms, enterobacteria, *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp. in relation to the conventional contaminated sterile milk method were of 0.997, 0.999, 0.998, 0.996 and 0.997; in the case of raw milk, they were of 0.998, 0.991, 0.994, 0.991 and 0.996, respectively. The experimental and practical results demonstrated that the operation of the method was in agreement with that described in literature and it constituted a convenient alternative for the milk laboratories of the country with limited resources for the quantification of microorganisms since it reduced the time and labor in the laboratory, offering results between 24-48 hours and increasing the yield in a 95%.

Key words: Rida Count, enumeration of microorganisms, conventional method.

La leche se utiliza en la alimentación humana por ofrecer una equilibrada composición de nutrientes que resultan de elevado valor biológico, se le considera uno de los alimentos más completos (1). Sin embargo su consumo no está exento de riesgos ya que puede alterarse en cada uno de los múltiples pasos que van desde su secreción de la vaca hasta su consumo. Las enfermedades de transmisión alimentaria asociadas con el consumo de leche cruda ocurren reiteradamente cada año (2). Los principales peligros a los que se encuentra expuesta son microbiológicos y químicos (3).

El CENLAC es un centro de control de la calidad e inocuidad de alimentos, y funciona como referencia en Cuba para la calidad de la leche en el país. Como parte de su trabajo se encuentra el control del cumplimiento de los requisitos higiénico y de inocuidad de la leche y sus derivados. En este sentido, para el control de la calidad higiénica o microbiológica de la leche se determina el conteo total de microorganismos, y en determinadas circunstancias se recomienda evaluar la presencia de algunos patógenos. Un 20% de los ensayos microbiológicos realizado en la industria de alimentos se emplean para analizar patógenos, el 80% restante son los ensayos para el conteo total de microorganismos, coliformes, mohos y levaduras (5).

La enumeración de microorganismos se ha realizado, tradicionalmente, mediante el método de Número Más Probable (NMP) y recuento en placa. Estos métodos son laboriosos, requieren un volumen considerable de tubos de ensayo y medios de dilución, así como espacio para el almacenamiento e incubación de las placas de cultivo. El desarrollo de métodos rápidos como son: Redigel, Simplate, Petrifilm, Medios cromogénicos, sistema Tempo, simplifican el trabajo, al requerir menor tiempo para obtener resultados, son fáciles de usar, precisos y económicamente rentables (4). Esto es de especial importancia en productos que son muy perecederos y necesitan una decisión rápida, como es el caso de la leche.

Uno de los métodos rápidos que se emplea en la actualidad para la detección de microorganismos en alimentos es el Rida Count, desarrollado por R-Biofarm consiste en placas con medios de cultivo deshidratado, listo para el uso (6). Este método está aceptado internacionalmente con su registro comercial. En aras de brindar respuestas rápidas y abaratar los costos, el CENLAC valoró la introducción de estos métodos para utilizar en sus trabajos de servicios, pero como se iba a introducir, por primera vez en el laboratorio y en el país, resultaba necesario hacer una comprobación del funcionamiento en nuestras condiciones. Según la norma ISO/IEC 17025:2006 no se requiere una valida-

ción completa dado que es un método comprobado internacionalmente, pero sí verificar si en el laboratorio funciona tal y como establecen los comercializadores. El objetivo de este trabajo fue evaluar el desempeño del método, en las condiciones de Cuba y el CENLAC de placas Rida Count a partir de la comparación con el método convencional para la enumeración de conteo total de microorganismo, coliformes totales, enterobacterias, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en el laboratorio CENLAC, centro de referencia para el análisis de la leche en Cuba.

Determinación de microorganismos.

Se realizó el recuento total de microorganismos, coliformes totales, enterobacterias, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* en muestras de leche reconstituida estéril e inoculadas con los microorganismos de elección para obtener tres niveles de concentración (10^3 , 10^2 , 10^1 ufc/mL). Se sembraron 20 réplicas de cada nivel y muestras de mezclas de leche cruda mediante los métodos que parecen en la Tabla 1. Se emplearon controles negativos constituidos por leche estéril sin inocular para todos los ensayos.

En todos los ensayos, los inóculos fueron preparados seleccionando las colonias características y se inocularon a un tubo de solución salina estéril (0,85%) hasta llegar a una turbidez comparable con el tubo N° 2 de la escala McFarland (3×10^8 ufc/mL).

Control de inóculo: En todos los casos se controló la concentración del inóculo realizando diluciones decimales seriadas 1:10 y sembrando 0,1 mL de las diluciones -5, -6, -7 en dos placas de Tripton Soya Agar (TSA) que se diseminaron con la ayuda de varillas L. Las placas se invirtieron e incubaron a 37°C por 24 horas. Se emplearon controles negativos constituidos por leche estéril sin inocular. Todos los inóculos fueron utilizados dentro de la primera hora de preparados y se consideraron válidos los conteos entre 20 - 200 ufc/mL.

Análisis estadístico: El conteo de unidades formadoras de colonias (ufc) fue transformado a logaritmo. Posteriormente, se realizó la comparación de los métodos mediante análisis de varianza simple, correlación de Pearson y regresión lineal. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico Statgraphics (versión 5.1).

La Tabla 2 muestra los parámetros de precisión de los diferentes niveles de contaminación de las muestras de leche estériles contaminadas y leche cruda. Con respecto al grado de concordancia entre los recuentos que se determinó con la media y la desviación estándar, los resultados obtenidos fueron en su mayoría menor del 10% del coeficiente de variación, lo que

TABLA 1. Ensayos, métodos y microorganismos./ *Essays, methods and microorganisms.*

Microorganismo	Método Convencional	Rida Count	Microorganismo utilizado
microorganismos totales	NC ISO 4833:2003 Agar para conteo en placa (PCA)	R1001 (PCA) modificado (TTC)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
coliformes totales	NC ISO 4832:2006 Agar violeta rojo bilis (VRBA)	R1002 (VRBA) modificado (X-Gal)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
enterobacterias	ISO 21528-2:2004 Agar violeta rojo bilis	R1009	<i>Salmonella typhimurium</i> (Laboratorio Control de Calidad, CENSA)
<i>Escherichia coli</i>	ISO16649-2:2001 Agar TBX	R1006 (VRBA) modificado (X-Glucorónico)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Salmonella</i> spp.	NC ISO 6579:2007 Agar XLD	R1004 Agar XLD modificado	<i>Salmonella typhimurium</i> (Laboratorio Control de Calidad, CENSA)

manifiesta un alto grado de concordancia entre los datos. Así como que las pendientes obtenidas presentaron valores cercanos a 1, lo que refiere la concordancia entre los métodos (Tabla 2).

La media de los conteos (\log_{10}) y la desviación estándar (DS) de las 20 réplicas en los tres niveles de contaminación de leche cruda fueron similares para ambos métodos como se muestra en la Tabla 2, excepto en el caso de los ensayos de enterobacterias y *Salmonella* en el nivel de contaminación más bajo (3×10^1), los cuales se correspondieron a 0,12 (0,03) y 0,14 (0,03), respectivamente. En las muestras de leche cruda los resultados obtenidos son semejantes por ambas técnicas en cada uno de los ensayos realizados 0,57 (0,56), 0,55 (0,52), 0,74 (0,72), 0,55 (0,50) y 0,20 (0,24) respectivamente.

En la Tabla 2 se observó que el coeficiente de correlación lineal (r^2) obtenido para el recuento de microorganismos totales, coliformes totales, enterobacterias, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., los cuales se encuentran entre 0,9964-0,999, evidenciando que existe una alta correlación lineal entre ambos métodos para cada uno de los análisis realizados. El análisis de varianza demostró que no existen diferencias significativas entre ambas técnicas, debido a que el valor de p fue mayor que 0,05.

Se analizó un total de 10 muestras de leche cruda, se observó que la diferencia entre ambos métodos es mínima en cada uno de los ensayos. Los valores obtenidos del coeficiente de variación (máximo 10%) demostraron que existe un alto grado de concordancia

entre los resultados obtenidos en las repeticiones de leche estéril contaminada en cada uno de los niveles utilizados y los obtenidos en leche cruda, demostraron la varianza relativa entre las mediciones.

Estos resultados son similares a los obtenidos en otro estudio comparativo de placas Rida Count en leche pasteurizada, queso doble crema y carne de hamburguesa, para el recuento total de microorganismos, coliformes totales, enterobacterias, *Escherichia coli*; en el cual se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9619, 0,941, 0,8875, 0,926 respectivamente. Evidenciando una fuerte correlación lineal entre el método tradicional y la técnica de recuento rápido Rida Count (7). Resultado similar fue obtenido por la corporación japonesa Chisso en el estudio de validación interna, realizado para el recuento de bacterias totales mediante el uso de Sanita kun (placas Rida Count) en 14 alimentos, donde el coeficiente de correlación lineal calculado fue de (r^2) 0,99 (6).

En el estudio realizado por la AOAC para la validación del método Rida Count (Coliformes R 1009) en 63 alimentos crudos, excluyendo los alimentos congelados tuvo como resultado un coeficiente de correlación lineal de 0,98, mientras que para los 26 alimentos inoculados en el ensayo de repetibilidad el coeficiente de correlación fue de 0,94 (8, 9).

Los resultados obtenidos demostraron que el sistema Rida Count tiene un comportamiento similar en el CENLAC al reportado en otros países, por lo que constituye un método apropiado y una alternativa factible para la cuantificación de microorganismos en leche.

TABLA 2. Comparación entre placa Rida Count y método convencional ($p > 0,05$)./ *Comparison between Rida Count plates and conventional methods.*

Alimento Nivel de Contaminación (ufc/mL)	Método Convencional (log ufc/mL)			Rida Count (log ufc/mL)			(r^2)	Ecuación regresión lineal
	\bar{X}	DS	CV	\bar{X}	DS	CV		
microorganismos totales								
3×10^3	4,08	0,03	0,78	4,08	0,03	0,73	0,997	$y=1,017x-0,055$
3×10^2	2,90	0,06	2,09	2,92	0,04	1,24		
3×10^1	0,50	0,16	8,99	0,44	0,14	9,46		
Leche Cruda (n=10)	8,03	0,57	7,05	8,06	0,56	6,97	0,998	$y=0,997+0,1046$
coliformes totales								
3×10^3	4,09	0,02	0,41	4,14	0,04	1,04	0,999	$y=1,097x+0,006$
3×10^2	2,20	0,04	1,84	2,12	0,05	2,34		
3×10^1	0,39	0,11	8,28	0,39	0,11	8,48		
Leche Cruda (n=10)	5,42	0,55	10,2	5,45	0,52	9,48	0,991	$y=0,9312x+0,4029$
enterobacterias								
3×10^3	6,16	0,04	0,65	6,17	0,05	0,83	0,998	$y=0,979x+0,124$
3×10^2	4,22	0,04	1,01	4,24	0,01	0,22		
3×10^1	2,24	0,12	5,45	2,32	0,03	1,47		
Leche Cruda (n=10)	4,47	0,74	17	4,48	0,72	16	0,964	$y=0,9379x+0,2288$
Escherichia coli								
3×10^3	3,76	0,04	1,01	3,89	0,05	1,37	0,996	$y=1,046x-0,084$
3×10^2	2,44	0,04	1,76	2,41	0,04	1,54		
3×10^1	0,47	0,13	7,91	0,45	0,16	6,77		
Leche Cruda (n=10)	5,42	0,55	7,51	4,68	0,50	10,4	0,991	$y=0,9312x+0,4029$
Salmonella spp.								
3×10^3	6,20	0,03	0,55	6,20	0,03	0,49	0,997	$y=0,973x+0,160$
3×10^2	4,23	0,06	1,30	4,27	0,02	0,43		
3×10^1	2,20	0,14	6,25	2,30	0,03	1,45		
Leche Cruda (n=10)	2,32	0,20	8,61	2,33	0,24	10,1	0,996	$y=1,046x-0,084$

REFERENCIAS

- Tronco, V. Manual para inspección de calidad de la leche. 2003. 2^{da} Ed.-Santa María: UFSM. Brasil. 2003. p. 168.
- Jayarao B, Donalson S, Straley B, Sawant A, Hegde N, Brown J. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *J Dairy Sci.* 2006;89:2451-2458.
- González F y Godoy Bibiana Juan. Riesgos asociados al consumo de leche cruda. REPIDISCA: (Base de datos en Internet). Actualizado 7 de Nov 2001; citado 11 Oct 2005. Disponible en Internet: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/>. Consultado Diciembre 2010.
- Herrans, C. Métodos rápidos y automatizados en microbiología alimentaria. Monográfico VI workshop MRAMA, Alimentaria Journal. 2008;392 (Abril): 109-113.
- Yuste J. y Capellas M. Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria, cada noviembre en la UAB. *VII workshop MRAMA*,

- Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España 2008. Disponible en: http://www.uab.es/PDF/PDF_1203938386239_es.pdf. Consultado Diciembre 2010.
6. Hiroshi M, Ushiyama M, Aoyama S, Iwasaki M. Sensitivity and specificity of the Sanita-kun Aerobic Count: internal validation and independent laboratory study. *JAOAC Int.* 2003;86 (2):355-366.
 7. Alonso Lina Ximena y Poveda Jeimy Alexandra. Estudio Comparativo de Técnicas de Recuento Rápido en el mercado y Placas Petrifilm para el análisis de alimentos. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. 2008. Disponible en Internet: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>. Consultado Enero 2011.
 8. R-Biofarma. RIDA®COUNT AOAC Performance Tested MethodSM RIDA®COUNT Coliform. Actualizado 6 de Abril 2005; citado 17 Febrero 2011; Disponible en Internet: http://www.fooddiagnostics.dk/ProSmart/dox/Godkendelser/R1002_AOAC-brochure.pdf. Consultado Enero 2011.
 9. Hiroshi M, Ushiyama M, Aoyama S, Iwasaki M. Evaluation of the Sanita-kun Coliforms, a dehydrated medium sheet for coliform detection. *JAOAC Int.* 2006;89(2):399-416.

Recibido: 30-5-2011.

Aceptado: 13-10-2012.