

# Assessment of feed additives produced from or containing microorganisms - Tackling antimicrobial resistance risks

---

Rosella Brozzi.

European Food Safety Authority, FEED Unit, Parma, Italy.

**Regulation (EC) No 1831/2003<sup>1</sup> stipulates that all feed additives intended to be marketed in the European Union (EU) must be safe for the target species, the consumers of products derived from the animals fed with the additives, the users and for the environment. The European Food Safety Authority (EFSA) is the EU body in charge of conducting the risk assessment of feed additives in line with the legal requirements. This work is carried out by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) with the support of the FEED Unit.**

**T**he FEEDAP Panel has produced a series of guidance documents intended to support applicants in the preparation of technical dossiers, and risk assessors in the evaluation of the contained data. These guidance documents are regularly updated to take advantage of the experience gained in evaluating the data and of the new findings in science and technology.

Microorganisms can be used as feed additives (e.g., probiotics, silage additives) or can be used as production strains for other additives (e.g., enzymes, amino acids, organic acids). A proper characterisation of these microorganisms is fundamental for the safety assessment. This includes, among other issues, consideration of their ability to survive antimicrobial treatments (i.e., antimicrobial resistance, AMR) and to spread this capacity. This provision is based on the

legal requirements. In fact Commission Regulation (EC) No 429/2008 prescribes that microbial feed additives should not contribute to the reservoir of antibiotic resistance genes already present in the gut microbiota of animals and in the environment.

So far approximately 140 strains intended to be used as feed additives have been assessed. From these, five have been found to be resistant to one or more antibiotics (EFSA, 2010, 2011, 2012a, 2012b, 2014). However, only in two cases the genetic basis of the resistance could be identified and in only one of these, the concern related to the potential transfer of the resistance determinants to other microbes could be dismissed. Consequently, in four out of these five cases the Panel could not conclude on the safety of the strains based on the criteria applicable at the time of the assessment.

---

<sup>1</sup> Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. OJ L 268, 18.10.2003, p. 29–43.

The FEEDAP Panel is currently revising its guidance documents. Within this activity, a new guidance document describing the data requirements and the approach underpinning the assessment of microbial and microbial-based additives has been produced<sup>2</sup>. In this document, the assessment of the AMR of bacterial feed additives is based on two sets of data:

- Phenotypic testing based on determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) for a battery of relevant antimicrobials,
- A search of the whole genome sequence for the presence of known AMR genes.
- The antimicrobials are chosen to detect a wide range of antibiotic resistance determinants and to cover those relevant for use in humans and animals (i.e., critically important antimicrobials (CIAs) or highly important antimicrobials (HIAs), last revision WHO, 2016). The possibility of transfer of resistance from viable microorganisms to other microorganisms is related to the genetic basis of the resistance and is considered to be most plausible when the resistance is mediated by added/acquired genes.

The current view of the FEEDAP Panel is:

- Bacterial strains used as feed additives or as a source of feed additives carrying acquired genes that confer resistance to relevant antimicrobial(s) are considered to represent a risk for target species and for those exposed to the additive.
- Bacterial strains used as a source of a feed additive carrying acquired AMR genes, when DNA fragments long enough to cover the corresponding complete genes are detected in the final product, the product is considered to represent a risk for target species and those exposed to the additive. However, if the absence of DNA from the production strain can be shown in the additive, this is not considered a risk.
- The guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms was subject to public consultation in the period June to September 2017 and is currently under revision to take account of the comments received. It is expected to be adopted by the FEEDAP Panel and published on the EFSA website in early 2018.

EFSA is actively involved in several other activities in the area of antimicrobial resistance. It provides independent scientific support and advice to risk managers on the risks to human and animal health related to the possible emergence, spread and transfer of antimicrobial resistance in the food chain and in animal populations, e.g., in the reduction of the need to use of antimicrobials in food-producing animals (EMA and

EFSA, 2016), in the monitoring and collection of information on antimicrobial resistance in food-producing animals and food (<http://www.efsa.europa.eu/en/biological-hazards-data/reports>).

For further information, visit: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/antimicrobial-resistance>

## References

- WHO (World Health Organisation) 2016. *Critically important antimicrobials for human medicine – 4th rev.* WHO Press. ISBN 978 92 4 151146 9.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); 2010. *Scientific Opinion on the safety and efficacy of the product Cylactin® (Enterococcus faecium) as a feed additive for chickens for fattening.* EFSA Journal 2010; 8(7):1661. [13 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1661.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); 2011. *Scientific Opinion on the safety and efficacy of Lactobacillus pentosus (DSM 14025) as a silage additive for all animal species.* EFSA Journal 2011;9(11):2449. [8 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2011.2449.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); 2012a. *Scientific Opinion on the safety and efficacy of Prostopora Max (Bifidobacterium animalis) as a feed additive for dogs.* EFSA Journal 2012;10(12):2964 [14 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2012.2964. EMA (European Medicines Agency) and EFSA (European Food Safety Authority), 2017.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); 2012b. *Scientific Opinion on the safety and efficacy of Toyocerin® (Bacillus cereus) as a feed additive for sows, piglets, pigs for fattening, cattle for fattening, calves for rearing, chickens for fattening and rabbits for fattening.* EFSA Journal 2012;10(10):2924. [34 pp.].
- EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), 2014. *Scientific Opinion on the safety and efficacy of Pediococcus pentosaceus (NCIMB 30044) as a silage additive for all animal species.* EFSA Journal 2014;12(3):3610, 12 pp.
- EMA (European Medicines Agency) and EFSA (European Food Safety Authority), 2017. *EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA).* [EMA/CVMP/570771/2015]. EFSA Journal 2017;15(1):4666, 245 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.4666.

<sup>2</sup>Draft FEEDAP Panel's guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. It was under public consultation until 15 September 2017 at <http://www.efsa.europa.eu/en/consultations/call/170615>



# Control microbiológico en alimentos V gama: normativa, riesgos, técnicas

*Los alimentos V gama poseen unas características especiales debido a sus métodos de producción, envasado y comercialización. Se describe cómo realizar el control microbiológico conforme a la normativa, las técnicas disponibles y los riesgos que conllevan.*

**D. Armando Marín Martínez**

Analytical Services Manager / Assistant Sales Manager  
Eurofins Análisis Alimentario Nordeste SL  
[armandomarin@eurofins.com](mailto:armandomarin@eurofins.com)

## Visión general de la normativa

Definamos en primer lugar lo que entendemos por alimentos V Gama: son platos preparados (productos ya elaborados para reducir al mínimo su preparación doméstica) sometidos a un tratamiento térmico (o equivalente) inferior a la esterilización, envasados al vacío o en atmósfera modificada y comercializados en refrigeración. Por otra parte presentan un valor

**Palabras clave:** límites legales, microorganismos alterantes y patógenos, técnicas analíticas, microbiología tradicional y rápida, plan de control.

TABLA 1

**Normas microbiológicas para comidas preparadas Grupo A y Grupo B según R.D. 3484/2000**

	Parámetros	Grupo A	Grupo B
Indicadores	<b>Aerobios totales</b>	n=5, c=2 m= 105, M= 106	n=5, c=2 m= 104, M= 105
	<b>Coliformes totales</b>	n=5, c=2 m= 103, M= 104	n=5, c=2 m= 101, M= 102
Testigos de falta de higiene	<b><i>Escherichia coli</i></b>	n=5, c=2 m= 101, M= 102	Ausencia en g
	<b><i>S. aureus</i></b>	n=5, c=2 m= 101, M= 102	n=5, c=1 m= 101, M= 102
Patógenos	<b><i>Salmonella</i></b>	n=5, c=0 Ausencia en 25 g	n=5, c=0 Ausencia en 25 g
	<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	n=5, c=2 m= 101, M= 102	n=5, c=0 Ausencia en 25 g

Fuente: Real Decreto 3484/2000

añadido, se entiende que son mínimamente procesados, esto es: el tratamiento térmico debe ser lo más débil posible para preservar los valores organolépticos y nutricionales, y además presentar la mínima cantidad de aditivos añadidos, por lo que su formulación (pH,  $a_w$ ...) y procesado se diseña con el fin de obtener este objetivo.

En el ámbito anglosajón se denominan REPFEDs, siglas a las que se refieren a su denominación en inglés “Refrigerated Pasteurized Foods of Extended Durability”, es decir, alimentos pasteurizados refrigerados de durabilidad ampliada.

De conformidad con el Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, único actualmente en vigor, si nuestro producto puede considerarse listo para el consumo, lo que el Reglamento define en su Artículo 2, como alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos, deberíamos cumplir con los criterios de seguridad alimentaria referidos en las categorías 1.2 y 1.3 del Anexo I de dicho Reglamento.

En suma, nuestro producto deberá presentar un recuento de *L. monocytogenes* menor a 100 ufc/g durante el periodo de vida comercial que hayamos establecido, si podemos demostrar que nunca se

sobrepasará este recuento. Y deberá presentar ausencia de *L. monocytogenes* (en 25 g) al dejar las instalaciones si no podemos demostrarlo.

Si nuestro producto no puede considerarse listo para el consumo, no presenta criterio microbiológico legal. Deberá indicarse entonces en el envase que debe cocinarse antes de su consumo y hay que tener en cuenta que esta indicación lo clasifica automáticamente en esta categoría.

Dado que hay una obligatoriedad implícita en el Reglamento CE N° 178/2002

que establece los requisitos generales de seguridad alimentaria, de producir alimentos seguros para el consumidor, nos vemos obligados a considerar otros microorganismos patógenos no incluidos en el Reglamento (CE) N° 2073/2005. Por lo que deberemos basarnos en Normativas derogadas, bibliografía o recomendaciones internacionales, las cuales adquirirán cierta legalidad (CE n° 852/2004 relativa a la higiene de los productos alimentarios) si se encuentran recogidas en los APPCC's de la empresa.

En la práctica nos basaremos en las normas microbiológicas derogadas de nuestro Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas:

- Grupo A: comidas preparadas sin tratamiento térmico y comidas preparadas con tratamiento térmico, que lleven ingredientes no sometidos a tratamiento térmico.
- Grupo B: comidas preparadas con tratamiento térmico, (**tabla 1**).

En el Reglamento (CE) n° 2073/2005 se establecen otras obligaciones que debemos considerar. Enlazando con la categorización de nuestro producto en los dos apartados del criterio 1.2, y de conformidad con el artículo 3, deben realizarse estudios de caducidad para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil del producto. En el Anexo II del Reglamento se enumeran las características de estos estudios, que tras la especificación

fisicoquímica del producto, pueden basarse en: bibliografía científica, histórico de datos de la empresa, modelos microbiológicos predictivos, estudios de caducidad real y estudios de caducidad con microorganismos patógenos inoculados “challenge test”.

En lo que respecta a la frecuencia de la toma de muestras en el artículo 4, delega la responsabilidad en el explotador de la empresa salvo que la misma esté establecida en el Anexo I y siempre teniendo en cuenta la naturaleza y dimensiones de la empresa.

El Reglamento remarca en su preámbulo la importancia de la toma de muestras del entorno como instrumento útil para identificar y prevenir la presencia de microorganismos patógenos en los productos alimenticios. Establece en su artículo 5, punto 2, que se tomarán muestras en las zonas de trabajo y el equipo de trabajo cuando sea necesaria para garantizar el cumplimiento de los criterios, y que las empresas alimentarias que produzcan alimentos listos para el consumo susceptibles de plantear riesgo de *L. monocytogenes* deberán tomar siempre muestras de las zonas y el equipo de producción.

Por último, el reglamento especifica los métodos analíticos de referencia a utilizar. Pero en el punto 24 del preámbulo recomienda que se utilicen otros métodos, en particular unos más rápidos, siempre que estos métodos alternativos produzcan resultados equivalentes. Así en el artículo 5, punto 5 autoriza el uso de métodos alternativos cuando estos estén validados con respecto al método de referencia establecido en el anexo I y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos similares internacionalmente aceptados.

## Selección de la microbiología en función del alimento

### Factores intrínsecos y extrínsecos

A la hora de plantear el control microbiológico de nuestro producto debemos conocer los riesgos microbiológicos alterantes y patogénicos que este presentará. La alteración de los alimentos y eventualmente el crecimiento de microorganis-



# EL SASTRE PARA TUS SISTEMAS DE LAVADO



[www.mimasa.com](http://www.mimasa.com)

## Especialista en sistemas de lavado y secado para la industria alimentaria.

Desde 1986, diseño y fabricación de maquinaria y tecnologías a medida para el lavado y secado en la industria alimentaria.

Los más de 30 años desarrollando soluciones innovadoras, junto con el talento y esfuerzo de nuestro equipo humano, son la base sobre la que se construyen nuestros equipos. Los clientes que eligen un sistema Mimasa tienen la tranquilidad de obtener una solución completamente personalizada y adaptada a sus necesidades. Además, saben que los sistemas Mimasa, gracias a la calidad de sus materiales, acabados y prestaciones, serán equipos que trabajarán al máximo durante muchos, muchos años.

Contáctenos. Sin duda alguna, sus problemas de lavado encontrarán una solución a medida en Mimasa.

### GAMA COMPLETA DE MAQUINARIA PARA EL LAVADO Y EL SECADO DE:



TABLA 2

Microorganismo	Límites de crecimiento			Aeróbico/ Anaeróbico	Tratamiento	Efecto patogénico
	<T <sup>a</sup>	<pH	<a <sub>w</sub>		Resistencia a la temperatura	
<i>B.cereus</i>	4	4,3	0,95	Facultativo	Alta (1)	INF y TOX
<i>Campylobacter jejuni</i>	32	4,9	0,99	Micro-aerófilo	Baja	INF
<i>C. botulinum A.</i> mesófilos/proteolíticos	10	4,6	0,93	Anaerobio	Alta	TOX
<i>C. botulinum E</i> psicrófilos/no proteolíticos	3,3	5,0	0,97	Anaerobio	Alta (2)	TOX
<i>C. perfringens</i>	12	5,0	0,95	Anaerobio	Alta	INF
<i>E. coli</i>	7	4,4	0,95	Facultativo	Baja	INF
<i>E. coli O157</i>	6,5	4,5	0,95	Facultativo	Baja	INF
<i>L. monocytogenes</i>	0	4,3	0,92	Facultativo	Baja(3)	INF
<i>Salmonella</i>	7 (5,2)	4,0	0,94	Facultativo	Baja	INF
<i>S. aureus</i>	6 (10 tox)	4,0 (4,5 tox)	0,83 (0,90 tox)	Facultativo	Baja	TOX
<i>V. cholerae</i>	10	5,0	0,97	Facultativo	Baja	INF
<i>V. parahaemolyticus</i>	5	4,8	0,94	Facultativo	Baja	INF
<i>Y. enterocolitica</i>	-1	4,2	0,96	Facultativo	Baja	INF
<i>Pseudomonas spp</i>	<0	5,5	0,97	Aerobio	Baja	-
Enterobacterias	2	4,4	0,94	Facultativo	Bajo	-
Bacterias ácido lácticas	4	3,8	0,94	Facultativo	Baja	-
Levaduras	-5	1	0,80	Facultativo	Baja	-
Mohos	<0	2	0,60	Aerobio	Baja	-

INF = infección. TOX = toxiinfección.

(1) Presentan mayor resistencia térmica que el *Clostridium botulinum* tipo E.

(2) Los *C. botulinum* mesófilos presentan mayor resistencia térmica que los psicrotrofos y solo son destruidos por esterilización, pero no crecen en refrigeración. Es necesario 80°C/10 minutos o equivalente para conseguir 6 reducciones decimales de *Clostridium botulinum* psicrotrofos.

(3) Es necesario 70°C/2minutos o equivalente para conseguir 6 reducciones decimales de *Listeria monocytogenes*.

Fuente: adaptación personal

mos patógenos es el resultado de la selección de microorganismos cuyas propiedades fisiológicas les permiten dominar numéricamente en los nichos que se originan de las interacciones de las propiedades físico-químicas del alimento (factores intrínsecos) y de las condiciones de elaboración, almacenado y distribución (factores extrínsecos). Así que el primer paso es conocer estos.

### Factores intrínsecos

Dentro de este tipo de factores podemos incluir a las materias primas (naturaleza, forma de conservación, ...), composición y formulación del producto (% sal, aditivos, ...), estructura del producto (influirá en el tratamiento térmico), microbiota natural, disponibilidad de oxígeno, acidez total y pH (muy importantes) y actividad agua (también de gran importancia).

### Factores extrínsecos

Incluiríamos el proceso de elaboración, sistema y material de envasado (vacío, atmósfera protectora, O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, ...), tratamiento térmico (temperatura/tiempo, anterior o posterior al envasado) y la temperatura de almacén y distribución.

### Riesgos existentes

De la combinación de factores intrínsecos y extrínsecos, esto es, de su efecto sinérgico o “barrera”, debemos deducir cuáles serán los microorganismos diana a considerar para nuestro producto.

Para este fin nos será de gran ayuda la utilización de una tabla de factores de crecimiento (tabla 2).

Así, en productos V Gama el tratamiento térmico destruye a los patógenos no resistentes al calor y a parte de los alterantes; el envasado en condiciones

reducidas de oxígeno, el almacenamiento a bajas temperaturas y la combinación (fundamentalmente) entre  $a_w$  y pH, inhibe el desarrollo de las esporas de los microorganismos resistentes al calor y bacterias vegetativas que han sobrevivido al tratamiento.

En estas circunstancias, en condiciones idóneas de proceso y almacén/distribución, en el producto sólo proliferarán microorganismos psicrófilos y anaerobios. Sin embargo y dado que debemos considerar la posibilidad de fallos en el proceso analizaremos:

- Como indicadores alterantes:
  - Bacterias aerobias totales.
  - Bacterias ácido lácticas, levaduras, mohos (si lo consideramos).
- Como indicadores de higiene:
  - Coliformes totales y/o enterobacterias.
  - *E. coli* betaglucoronidasa+
- Como microorganismos patógenos:
  - Estafilococos cuagulasa positivo.

- *Salmonella ssp.*
- *Listeria monocytogenes* (investigación y/o recuento).
- *Bacillus cereus* (en productos con alto contenido en féculas o vegetales).
- *C. perfringens* (en producto con carne).

### Riesgos emergentes

Vivimos en un mundo global y la movilidad de personas, animales y mercancías es constante, se consumen alimentos a miles de kilómetros del lugar donde se han producido. Esto unido a que los microorganismos están cambiando constantemente para evolucionar y adaptarse, nos da una idea de la dificultad de enumerar los posibles patógenos emergentes y a su vez de la importancia de su vigilancia. Tan es así que dependiente de la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), en el año 2008 se creó la Unidad de Riesgos Emergentes (EMRISK) con la responsabi-

**FOODSAFETY**  
by PROQUIMIA

Especialistas en  
**Seguridad  
Alimentaria**

Te ayudamos a  
**aumentar**  
tus estándares de higiene

Somos un equipo interdisciplinar que trabajamos para garantizar la correcta implementación y funcionamiento de los procesos de higiene, mediante soluciones efectivas y adaptadas a tus necesidades.

  
**PROQUIMIA**  
www.proquimia.com

  
Sistema de Gestión de Calidad  
ISO 9001:2015  
ISO 14001:2015  
OHSAS 18001:2007  
www.tuv.com  
ID: 310066666

pfs@proquimia.com  
www.proquimia.com     
**MYPROQUIMIA**  
NUEVA ÁREA DE CLIENTES DE PROQUIMIA

FIGURA 1

**Método-tiempo de análisis de *Listeria monocytogenes***

<b>BACGene PCR</b>	Enriquecimiento	Lisis	PCR		
<b>BACSpec ELISA</b>	1 Enriquecimiento	2 Enriquecimiento	Incbdo	ELISA	
<b>ISO 11290-1</b>	1 Enriquecimiento	2 Enriquecimiento	Sembrado	Subcultura	
	-----24h-----		-----48h-----		-----3d-----4d

Fuente: Dr Nicholas Krohn, 23 de mayo de 2017. Eurofins I Gene Scan. Setting Standards

lidad de establecer procedimientos y realizar las acciones necesarias para poder identificar riesgos emergentes procedentes de alimentos y piensos.

Existe una creciente preocupación por *E. coli* O157:H7 (vegetales frescos y ciertos productos cárnicos), *Campylobacter jejuni* (en carne de aves), *Yersinia enterocolitica* (en vegetales frescos), virus transmitidos por alimentos (vegetales frescos, ostras, ...), transmisión de cepas resistentes a los antibióticos y todo ello sin olvidar viejos patógenos que no dejan de perder su importancia, como *Salmonella spp* con la aparición de nuevas cepas patógenas.

En V gama, el interés por aplicar tratamientos más débiles para obtener productos organolépticamente más valorados y el “factor consumidor” como causante de la “ruptura de la cadena de frío”, ha hecho que sean las bacterias esporuladas psicrotrofas (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *C. botulinum* tipo E) los posibles “patógenos emergentes “a vigilar”.

**Técnicas empleadas**

**Tradicional vs rápidas**

El aumento de la preocupación por la seguridad alimentaria, la implantación de los APPCC’s y sistemas de calidad, el cumplimiento de las expectativas de nuestros clientes, ..., en suma, la necesidad de liberar productos conforme resultados, nos obliga a analizar un gran número de muestras y a obtener resultados rápidos que permitan aplicar acciones correctivas inmediatas en la cadena de fabricación. Esto influye tanto a los laboratorios internos de la propia industria como a los laboratorios externos contratados, por ello el auge de los métodos rápidos.

Podemos ver (figura 1) a modo de ejemplo el efecto del tiempo de análisis de *Listeria monocytogenes* según la diferente metodología empleada.

Ahora bien, tanto por PCR como por ELISA será necesario confirmar los resultados “positivos” (presuntos positivos), con lo que se dilataría dicho tiempo. Son estas particularidades de los métodos analíticos (tabla 3) las que hay que tener en cuenta para realizar una buena elección.

Deberemos por lo tanto definir nuestro propósito, conocer las ventajas y desventajas de los métodos empleados y aplicar una ecuación riesgo-beneficio. Siempre teniendo en cuenta además el efecto matriz que nuestros productos pueden tener en el método.

**Predictiva**

La microbiología predictiva comprende el estudio de la respuesta de crecimiento, o de inhibición, de microorganismos que crecen en alimentos, en función de factores que les afecten (temperatura, pH, gases, etc.) y a partir de estos datos crear modelos matemáticos para predecir lo que sucederá durante el almacenamiento y procesado.

Es una herramienta útil que nos dará respuestas rápidas y anticipadas para:

- Predecir la vida útil (ya citamos anteriormente que así se considera en (CE) nº 2073/2005).
- Calcular el tiempo de vida comercial en el que se garantiza que no crece un patógeno (ej: *L. monocytogenes*) hasta alcanzar los niveles de riesgo.
- Desarrollar productos. Prediciendo las consecuencias microbiológicas por cambios de composición o proceso.
- Inspección y muestreo. Obteniendo información para planear tiempos de muestreo y estimar las necesidades del mismo.



En su aplicación se requieren conocimientos previos de los programas informáticos, así como de las limitaciones de los modelos matemáticos que se contemplan, los cuales pueden no ajustarse a una situación real empresarial.

Se consideran tres tipos de modelos.

- Modelos primarios: describen cambios en el número de microorganismos u otras respuestas microbianas con el tiempo.
- Modelos secundarios: describen las respuestas de los modelos primarios a los cambios en las condiciones medioambientales.
- Modelos terciarios: son programas de ordenador que transforman a los modelos primarios y secundarios en herramientas de fácil uso para los usuarios del modelo.
  - ComBase: <https://www.ifr.ac.uk/ComBase/>
  - Pathogen Modeling Program. PMP 6.1: <https://www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm>
  - Seafood Spoilage Predictor (SSP) <https://www.dfu.min.dk/micro/ssp>
  - Food Spoilage Predictor (FSP) <https://www.hdl.com.au/html/body-fsp.htm>
  - nuevos en desarrollo: IRTA

### Novidades

Resulta difícil hacer previsiones a largo plazo, en un mundo tan cambiante como el actual es más prudente hablar de tendencias. Una de ellas en estos últimos años es la investigación sobre plataformas moleculares más sofisticadas, biosensores, microarrays, nanocantilevers y dispositivos “lab-on-a-chip”. Estas tecnologías fusionan la “biología”, la nanotecnología y la electrónica, con el objetivo de crear sistemas sencillos, manejables, que además de en laboratorio puedan emplearse y/o integrarse en la línea de producción, e incluso puedan integrarse en envases o ser utilizados por el propio consumidor.

### Planteamiento control - plan de control microbiológico

Establezcamos una propuesta de muestreo para un “producto cárnico de V gama” (carrillera de cerdo confitada, picanton relleno de jamón ibérico, paletilla de cordero asada al ajillo, ...). Este muestreo presentará diferencias dependiendo del tipo

# Ciencia y Experiencia a su servicio



## LABORATORIO DE ANÁLISIS Y ASESORAMIENTO TÉCNICO QUÍMICA, MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

Laboratorio Autorizado por el Ministerio de Sanidad y MARM  
Empresa Colaboradora del Ministerio de Medio Ambiente  
Acreditado para el control de Antibióticos y Residuos en Carnes

### ANÁLISIS PARA

- Industria Alimentaria
- Residuos de Acción Farmacológica
- Patología Animal
- Aguas potables
- Vertidos industriales

### ASESORÍA EN

- Proyectos de Calidad (ISO 9000)
- A.P.P.C.C.
- Normativa
- Control de Procesos

**ALKEMI**  
Análisis y Consultoría

#### Central

E-mail: [alkemi@alkemi.es](mailto:alkemi@alkemi.es)

C/ Tierra de Barros, 2  
28820 COSLADA (Madrid)

Tel: 91 673 91 49 • Fax: 91 673 91 48

#### Delegación Noroeste

Lugar Montemogos, 151. Beluso  
36937 BUEU (Pontevedra)  
Tel/Fax: 986 415 279

#### Delegación Castilla y León

C/Miriam Blasco P 147, 2ºB  
47014 VALLADOLID  
Tel/Fax: 983 34 59 74

TABLA 3

**Comparación características métodos analíticos tradicional y rápido**

**MÉTODO TRADICIONAL**

- Mucho tiempo y laborioso.
- Simple, práctico, poca experiencia (a veces hay que tenerla para reconocer colonias).
- Económico.
- Mucho volumen de material y medios.
- Son métodos de referencia (legales).
- Analizamos células vivas.
- El crecimiento es específico (selectivo) y se inhiben otras.
- Suele ser a la vez cualitativo y cuantitativo (informa de la severidad).
- Sólo puede analizarse un patógeno a la vez.

**MÉTODO RÁPIDO**

- Menor tiempo, acción correctora rápida (no liberar productos, no comprar materias primas, ...).
- Costo elevado de los equipos, pero puede amortizarse por los beneficios de su rapidez, mayor rendimiento y menor mano de obra.
- Son “alternativos”. La empresa tendrá que validarlos (ISO 16140:2003), pero muchos ya están certificados por organismos internacionales (AFNOR, MICROVAL...) Paradójicamente esta certificación puede facilitar la certificación interna.
- No se analizan células vivas (no es aplicable a ciertos métodos mejorados, Petrifilm, medios cromogénicos).
- En métodos de recuento indirecto hay que establecer una correlación entre “nuevas medidas” y “viejas unidades” (colonias formadas).
- En métodos ausencia/presencia detectamos parte de la célula. Podemos detectar microorganismos muertos que no son capaces de crecer en medios artificiales (falsos positivos).
- Sobre todo en inmunoensayos pueden darse reacciones cruzadas por proximidad filogenética (falsos positivos).
- Falsos negativos por no reconocimiento de la “diana” (mutaciones genéticas) o inhibición de la reacción.
- En inmunoensayos y PCR, se necesita un “preenriquecimiento” (limita la rapidez) para: diluir inhibidores, recuperar dañadas, evitar la heterogeneidad de la distribución de los microorganismos en el alimento y conseguir un número de microorganismos acorde con la sensibilidad del método.
- Puede conseguirse enriquecimientos más cortos con métodos de concentración (ultrafiltración, atg-atc, magnetismo).
- Todos los positivos tienen que ser confirmados, lo que dilata el tiempo total de análisis, en estos casos.
- La mayoría daña la célula, para confirmar es necesaria “otra” muestra.
- Posibilidad de realizar análisis de varios patógenos a la vez (PCR, microarrays).
- Posibilidad de investigar presencia de toxinas.

de ingredientes y de los diferentes tipos de proce-  
sado: momento en que se aplica el tratamiento tér-  
mico (tras envasado al vacío, tras envasado en at-  
mósfera modificada o antes del envasado en  
atmósfera modificada), si algunos de los ingredientes  
son cocinados (“marcado de carne asada”) en etapas  
anteriores al tratamiento, tipo de maquinaria y equi-  
pamiento que se utiliza, etc. Así que parece lógico  
establecer un plan genérico.

**Introducción**

Debido a la distribución heterogénea de los mi-  
croorganismos en los alimentos dentro de un lote y  
entre lotes, la seguridad de los alimentos no está  
garantizada ni controlada por pruebas microbioló-  
gicas, sino por un enfoque preventivo y adecuada

implantación de los APPCC’s. (punto 5 preámbulo  
Reglamento (CE) nº 2073/2005).

Dentro de este enfoque preventivo toma gran im-  
portancia el Análisis de las Tendencias de los datos  
que genere nuestro plan microbiológico, “cuando se  
observe tendencia a resultados insatisfactorios, se  
adoptarán sin demora las medidas adecuadas para  
rectificar la situación con el fin de evitar la repetición  
de los riesgos microbiológicos” (Art. 9 Reglamento  
(CE) nº 2073/2005).

**Objetivos de las pruebas  
microbiológicas**

Las pruebas microbiológicas deberían servirnos  
para verificar y supervisar que los PCC están ade-  
cuadamente controlados. Demostrar con evidencias

analíticas (documentales) que el proceso está bajo control y productos elaborados cumplen con los criterios microbiológicos legales y/o establecidos (los datos obtenidos nos deben servir para obtener una base de datos para el análisis de tendencias). Validar nuevos procesos, productos o equipos, estableciendo estándares para su control. Liberar por resultado en algunos productos con alto riesgo asociado o como exigencia de nuestros clientes. Y cumplir con las especificaciones de nuestros clientes.

### Criterios microbiológicos (parámetros)

Tendremos que fijarnos criterios legales (el no cumplimiento califica al producto como no apto para el uso previsto); “recomendaciones/especificaciones internas” (el no cumplimiento obliga a una acción correctora) y en muchos “casos especificaciones contractuales” (acordadas con nuestros clientes).

### Frecuencia y número de muestras

A la hora de establecer la frecuencia de análisis es importante considerar el concepto de «lote»: grupo o conjunto de productos identificables obtenidos de un proceso determinado en circunstancias prácticamente idénticas y producidas en un lugar dado en un período de producción determinado. El tamaño del lote es un punto clave a considerar en cualquier acción de gestión de riesgo.

La frecuencia de análisis microbiológicos no está legalmente establecida y debe ser el fabricante el que la determine conforme considere adecuado en sus APPCC's (Art 4, pto2. Reglamento (CE) nº 2073/2005)

Para establecer la frecuencia debemos considerar la evolución de riesgo del producto o materia prima a analizar:

- Riesgos asociados.
- Conocimiento del producto o proveedor en su caso.
- Historial (tendencias) del producto o proveedor en su caso.
- Volumen del lote considerado.

Número de unidades de muestras a analizar (n) y establecido en el anexo I del Reglamento (CE) nº 2073/2005, puede reducirse si el fabricante puede demostrar que cuenta con un APPCC eficaz. (Art 5, pto.3).

### Puntos de muestreo

#### Materias primas

A considerar: proveedor, producto, lote. Muy importante las materias primas que no han sufrido transformación (carne, ...), en su mayoría deberán servirnos para estudiar tendencias (indicadores), tan sólo algunas de mayor riesgo y si lo permite su vida

## SISTEMA HAC-D

Ahorra con el NUEVO SISTEMA HAC-D los consumos de agua, energía y productos en las tareas de Limpieza y Desinfección



Comprometidos con una higienización eficiente y respetuosa con el medio ambiente



betelgeux.es

+34 962 871 345  
betelgeux@betelgeux.es

## MATADEROS MÁS SOSTENIBLES



FEEL SAFE WITH US

comercial, podrán comprarse por resultados positivos y en tal caso no deberán entrar en el proceso hasta tener los resultados.

### Proceso

Materias primas o productos en procesos intermedios, nos servirán para conocer el efecto del proceso sobre patógenos e indicadores y controlarlo en su caso.

### Superficies y ambiente

Superficies: El objetivo es comprobar la eficacia del programa de limpieza y desinfección, crear tendencias e investigar/validar nuevos productos o sistemas de limpieza. Deben realizarse tras la limpieza y desinfección o antes de empezar el proceso de producción (preoperativo). En algunos casos podremos controlar superficies durante el proceso de fabricación (operativas) para conocer la influencia de su “carga bacteriana” en el producto.

Estableceremos un plan que contemple superficies en contacto con el producto (más importantes) y superficies que no lo estén. Pueden ser rotativos por puntos, productos, turnos de trabajo y días. La frecuencia puede disminuir conforme resultados. Se debe hacer especial hincapié en zonas de difícil limpieza.

Podremos utilizar sistemas rápidos de análisis (ATP, o sistemas similares) que nos permitirán por su rapidez supervisar puntos de contacto críticos y no utilizarlos en caso que no se consideren limpios.

Debemos establecer un programa específico para el control de *Listeria spp/L. monocytogenes* en superficies. (Art 5, pto.2 Reglamento (CE) nº 2073/2005).

Control ambiental: importante en envasado y sobre todo si el envasado es posterior al tratamiento. También a controlar los gases de envasado/frío.

### Agua

RD 140/2003. A considerar: red/captación propia. Limpieza y desinfección/ingrediente. Rotación puntos muestreo. Fines de línea.

### Manipuladores

Hisopado/Toallas/Esponjas de manos o guantes como en el caso del control de superficies en operativo / preoperativo y considerando la labor de los mismos.

### Producto final

A considerar: producto, tipo y lote.

Será evidencia documental de que todo el proceso ha funcionado correctamente. A la hora de establecer frecuencias remitirnos al concepto de lote y lo descrito en el punto “Frecuencia y número de muestras”.

### Vida útil

Dado que tenemos que demostrar que a lo largo de toda su vida útil nuestros productos son seguros y apropiados para su consumo, necesitamos planificar la realización de estudios de caducidad que tengan en cuenta las condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacén y uso. No debemos olvidar que es obligación legal que los fabricantes de alimentos listos para el consumo (RTE) realicen estudios de vida útil para *L. monocytogenes* especialmente si permiten el crecimiento de la misma.

La elaboración de un histórico de datos de los niveles de microorganismos existentes al principio, durante y al final de vida útil nos permitirá verificar y confirmar que dicha vida útil establecida es apropiada y no supone ni un riesgo ni una alteración organoléptica significativa. Con la particularidad de que se corresponderá con la realidad del perfil de contaminación y comportamiento microbiológico de los productos en relación a la empresa.

Tendremos que revisar la “vida útil” siempre que realicemos modificaciones en productos o procesos.

### Acción

En todo control microbiológico deben quedar suficientemente claros los límites a considerar y las acciones a tomar en caso de desviación de dichos límites.

### Conclusiones

---

Podríamos resumirlas en: conocer bien mi proceso y mi producto (análisis de riesgos); basarse en la legislación y estar informado, (para tener en cuenta y conocer los posibles riesgos emergentes); aplicar las mejores técnicas en función del objetivo y fin buscado; realizar mi plan de muestreo en base a los puntos anteriores y revisar dicho plan cada vez que haya un cambio significativo que afecte a cualquiera de los puntos anteriores.

### Bibliografía

---

Pueden encontrar la bibliografía de este artículo en [www.eurocarne.com/documentos/bibl26703.pdf](http://www.eurocarne.com/documentos/bibl26703.pdf). e

# Uncertainty of measurement of microbiological counts

---

Seppo Ilmari Niemelä  
sepponiemela89@gmail.com

## Introduction

Laboratories operating under ISO/IEC 17025 accreditation and related systems are required to evaluate measurement uncertainty (MU) for the analyses they conduct, and to report it when relevant. This requirement was brought to the attention of microbiologists in the 1990s. The initiative came from the chemical profession.

A comprehensive Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM) elaborated by a wide international group of experts on metrology, published by ISO in 1993, became the basic document for MU evaluation. The principles were "interpreted" in a more practical way for analytical measurements, mainly of chemical nature, by the EURACHEM/CITAC Guide (1995, second edition in 2000). Both documents exclude measurements based on counts.

Because of the central position of counts in microbiological monitoring, microbiologists felt it necessary to make a contribution of their own to the MU discussion. The work began first in Finland (MIKES) and was soon followed by two ISO technical committees ISO/TC 34 (food and animal feeding stuffs) and ISO/TC 147 (Water).

Results by an MPN method are not regular counts. Enumeration by MPN methods, however, is increasingly important in microbiological monitoring. The MPN principle is therefore included.

## Uncertainty of measurement

There is always a great deal of general uncertainty to microbiological test results. The past history of the sample

may affect the viability of the target microbe, the microbial populations of the sample may interact in the detector during incubation, etc. It is not possible to know what percentage of the target population is caught by the analysis at any particular time. Different nutrient media will give different answers, and so on.

Uncertainty of measurement (MU), is defined by ISO (1993) as "a parameter associated with the result of measurement, that characterises the dispersion of the values that could reasonably be attributed to the measurand". The definition is quite general and leaves open the detailed content of MU and does not define what is 'reasonable' in the dispersion of the results. It leaves room for consideration what sources of variation should be included in the measurement uncertainty.

The MU value is accordingly attached to the result and not the act of measuring. The MU estimation gives a measure of the confidence that that can be put on the analytical results, not on the laboratory competency. (ISO 19036).

This is an important distinction in microbiology where a considerable parts of the variation is often generated without an identifiable cause.

## Determination of MU, two approaches

Microbiological count data is generated when the microbial concentration of a laboratory sample (portion of material brought to the laboratory for analysis) is estimated by a microbiological counting process. In microbiology, as well as in chemistry, the test result is derived from several observed values often involving many measurements.

The test result is calculated from the final counts, taking into account the dilution and the volume of the test portion. Volume measurement uncertainties are involved. Additional uncertainty is caused by incubation, operator differences and uncertainty of counting. On top of everything is the intrinsic variation, random distribution of particles in perfectly mixed suspensions.

There are two general approaches for estimating the actual or potential variability of the test result (the uncertainty of measurement). They are nowadays preferably called the component approach and the global approach.

### Recent history

Development of standards or technical guides for the evaluation and expression of measurement uncertainty for microbiological counts was begun independently and almost simultaneously for food and water microbiological methods. Expert groups were available at the time in technical committees TC 34 (food and animal feeding stuffs) and TC 147 (water).

Obviously, the microbiological techniques and many methods were the same for food and water. It was natural that an attempt was made to harmonise the uncertainty estimation of water and food microbiological methods. In the end, however, it proved impossible to agree on a common standard at this stage. Food microbiologists thought the global approach more appropriate and water microbiologists wanted a guide on the component approach. There is a difference in efficiency of the approaches depending on the situation.

ISO/TC 34/SC 9 considered that the "step-by-step" (component) approach does not apply satisfactorily in the case of the microbiological analysis of food, where it is difficult to build a really comprehensive model of the measurement process. For reasons they listed for instance: "possibility of overlooking a significant source of uncertainty, the analyte is a living organism, whose physiological state can be variable, and the analytical target includes different strains, different species, and different genera". The working group concluded that, for these reasons, the microbiological analyses of food do not enable a metrologically rigorous and statistically valid estimation of MU (ISO/TS 19036:2005). This cannot be the full reason, however, because the same difficulties are present in water analysis as well.

The working group for food found that the global design is not applicable to enumeration using a most probable number (MPN) technique or the analysis of low levels of microorganisms (10 colonies per plate being the limit).

The important water microbiological methods of health-related indicator species and pathogenic organisms must

function at very low counts, at the border of the limit of detection. Also methods based on the MPN technique are almost necessary in water analysis. The component approach, which has no limitations concerning low counts and the MPN principle, therefore, became the chosen approach for water.

### Component approach

The component approach is also referred to as the "step-by-step" or "bottom-up" procedure. It is based on identifying the components of uncertainty of the analytical process. Each of them is separately evaluated in whatever way is feasible. The individual components are mathematically combined to correspond with the design of the test procedure. This is the procedure introduced by the original uncertainty document GUM (ISO 1993).

In practice it means forming a mental picture of the process, which is almost the same for all microbiological methods (Fig. 1). It is also helpful to write down the entire formula for calculating the final result. Often it appears that the result is based on ten or more elemental measurements (mostly volumes). The uncertainties of the elemental operations are combined by what is called the law of propagation of uncertainty to give an estimate of the combined uncertainty.

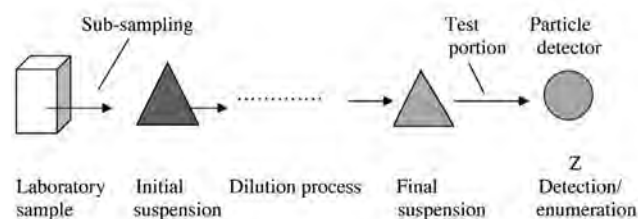


Fig. 1. Graph of a typical microbiological counting procedure.

A simple procedure without duplication is normal in daily routine analysis of samples. Formerly, it was common to duplicate the last step.

### The law of propagation of uncertainty

The law is based on the idea of the additivity of variance. The combined standard uncertainty ( $u_{comb}$ ) is obtained as the 'quadratic sum' of  $n$  independent components of uncertainty ( $u_1, u_2, \dots, u_n$ ):

$$u_{comb} = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + \dots + u_n^2}$$

## uncertainty

The uncertainty components are expressed in a scale where variances are known or believed to be additive (usually logarithmic or relative scale).

It is sometimes instructive to group the components of uncertainty. Division into three groups: sub-sampling (or matrix), analytical procedure, and detector might help decide which of the approaches, component or global, would be best.

An important property of the quadratic sum is namely the powerful influence of large values. Unless there is a large number of small values, contributions that are less than one third of the largest need not be quantified in detail. If matrix variability is dominant, like it probably is in difficult-to-mix solid foods, the choice is the global approach. If the matrix uncertainty is negligible, like it is in water and liquid foods, then the best choice is the component approach.

### Component estimation

What is being measured should be clearly defined. The equation used to calculate the value of the measurand at the end of the method process is a good starting point.

On the whole, general quantitative microbiological analyses are very straightforward, most being based on the same general principles, i.e. subsampling, dilution, plating, incubation, and counting (with, on occasion, confirmation of the identity of organisms) Forster (2003).

Not all identified contributions to uncertainty will make a significant contribution to the total uncertainty.

There are two general ways of determining the values of variance components, called Type A and Type B evaluation.

Type A evaluation consists of calculating the standard deviation (standard uncertainty) from a series of independent parallel measurements  $x_1, x_2, \dots, x_n$  of the test quantity using the conventional statistical formula for experimental standard deviation. It can concern the entire analytical process (the final result) or parts of it (for instance repeatability of pipetting or uncertainty of counting, etc.).

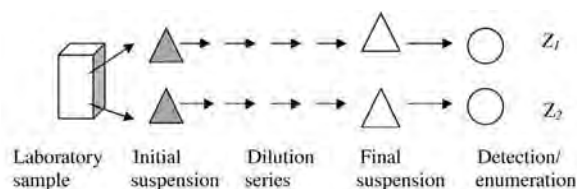
In Type B evaluation, the numerical value of a component of uncertainty is obtained by other means than statistical methods, most importantly from assumed statistical distributions. Some may be accounted for by data already available in the laboratory or in published tables.

### The global approach

In the global approach, special experiments are necessary. The entire analytical process is repeated, at least in duplicate, in

order to obtain an empirical estimate of the variability of the test result (Fig. 2).

The process has also been called the "top-down" approach. The term "global" was invented to convey the idea that even all unknown sources of uncertainty are believed to be included.



**Fig. 2. Minimum design for a basic experiment for the global uncertainty of measurement.**

The standard statistical formula for standard deviation is applied to calculate an estimate of the uncertainty of measurement.

Microbiological testing laboratories generally have a program whereby a certain number of samples are analysed at least in duplicate. Duplicate data for a particular test and for particular types of samples collected over a period of time can be analysed to determine the standard deviation. If all normal sources of variation in the method are taken into account it is called the intermediate (or intra-laboratory) precision of the test method. The sources of variation include storage effects, laboratory environmental effects, operator effects, effects of using different items of equipment, different batches of media, etc. This is the preferred extent of uncertainty likely to be reported as a global estimate of MU.

Subsampling procedures are normally included in it whereas external sampling is not.

The MU estimate does not characterise the analytical method itself independently from the laboratory which implements it. The critical factors associated with the method or the laboratory should be identified and demonstrated to be under control. A re-assessment of the MU is required following changes to any of the critical factors.

In food microbiology, the effect of the matrix on MU cannot be avoided whereas the influence of the contamination level can be eliminated by log transformation. In water microbiology the matrix effect is generally negligible and the contamination level is the main cause of differences in MU.

### Problems of the global approach

In the global method, the sources or causes of variation are not identified and assessed individually. This may be seen as

an advantage because the unknown sources of uncertainty are assumed to be included even though it is not known why and how.

Standard deviation based on two values is very imprecise. The experimental unit depicted in Fig. 2 should be repeated many times. ISO/TS 19036 proposes a minimum of ten repetitions.

The aim of the global approach is to generate MU estimates that need not be reassessed unless some important factor in the analysis chain is changed significantly. A major problem here is that it is not possible to know what factors are important because they are not evaluated separately in the global approach.

Chemists sometimes speak of the MU of methods. In microbiology it is not possible to think of the uncertainty of methods independent of the matrix, the target microbe, and the concentration of the analyte.

In food microbiology, the effect of the matrix on MU cannot be avoided. The influence of the contamination level can be eliminated by log transformation.

The standard deviation of reproducibility shall be estimated for each type of target microorganism and for each matrix, for a given method that the laboratory uses for producing its routine results. This may lead to very extensive trials when the laboratory analyses a large variety of matrices.

Many microbiological laboratories have procedures available for monitoring variability in results. The analysis of a natural sample is duplicated under intermediate reproducibility conditions. (Same sample, same day, same laboratory, but different operators and equipment.) It is relatively easy to incorporate such duplication within daily routine analyses. It only takes some planning and a little extra work.

For global MU evaluation, the estimate should not depend on the concentration of the analyte. This is only possible if the variability of sub-sampling and the analytical procedure (dilution, incubation, counting, etc.) overwhelm the intrinsic variability of the final count that follows the Poisson distribution. The relative Poisson variation (distribution uncertainty) increases dramatically when the counts per plate become small. That is the main reason why MU standard for food microbiology (ISO/TS 19036:2006) had to exclude the estimation of uncertainty of low numbers (less than 10 colonies counted). MPN methods that always operate with low density suspensions are also not included in the global standard.

### Problems of the component approach

Many separate calibration experiments are needed to establish reliable estimates of a great number of individual operational steps in the component approach. The components are derived by various means, such as from assumed statistical distributions, empirical calibration data or QA data, and literature. Some of them are quite easy, for instance checking the uncertainty of volumes by weighing.

A special problem are the causes of uncertainty that do not appear in the calculation of the final result. Effects of incubator environment (time, temperature, and humidity variations, positional effects), personal differences in recognition and counting of colonies and equipment influences should be estimated. They might require special trials.

Nevertheless laboratories shall at least attempt to identify all the components of uncertainty and make a reasonable estimation. In the evaluation of the measurement uncertainty of a method, the EURACHEM guide requires the analyst to look closely at all possible sources of uncertainty within a method and states that "in practice, a preliminary study will quickly identify the most significant sources of uncertainty" which will be the dominating influences in the total uncertainty of the method. "Method" in this case meaning the medium, matrix, microbial population, incubation environment complex.

### MPN

MPN methods are mostly connected to simple designs. The practical procedure might involve only direct measuring of a sub-sample volume and the counting of positive tubes. It is safe to assume that the water sample can be mixed perfectly. The uncertainty of the MPN test result therefore consists of three components: uncertainty of volume measurement, distribution uncertainty, and the uncertainty of counting.

In a perfectly mixed sample there is no other sub-sampling variability than that connected with the inherent distribution variation (Poisson and binomial in the case of MPN). It is great at the low particle density where MPN methods operate and it can be modelled mathematically.

Volume uncertainty is negligible compared with the distribution uncertainty. It is only the uncertainty of counting that might add significantly to the combined uncertainty.

### Methods and bias in microbiology

An important principle in general metrology is to correct the result for systematic error (bias). Physicists and chemists



are familiar with it and apply correction factors routinely. Microbiologists are very reluctant to apply corrections even when it is apparent that the count may be seriously affected (too low or too much under influence of personal interpretation, for instance).

Microbiological methods can be considered what the EURACHEM guide calls 'empirical methods' (Forster, 2003). They are methods where the analytical results are dependent on the procedures used in the analysis. The method accordingly defines the measurand or, in other words, the "right" answer is not only a property of the sample or the target organism, but also of the method. (Microbiologists know well that different media give different answers in the same sample.) Possibly the majority of quantitative microbiological methods can be considered to be empirical methods, where results generated are dependent on the nutrient medium in use, time and temperatures of incubation, and inclusion or exclusion of resuscitative steps in the methods. The bias associated with the results cannot be accurately defined and is conveniently ignored or considered zero. Microbiologists are comfortable with that. In fact, they have always been reluctant to apply any bias corrections in their results for the following obvious reasons (Forster 2003):

- "It is virtually impossible to know the exact microbial concentration of any sample, natural or artificial."
- "Certified reference materials for running as controls alongside tests are not generally available and where these are available, it will be unlikely that they will be matrix matched."

In other words, the true value is not known.

### Uncertainty in microbiology: some historical notes

Long before the introduction of the GUM and EURACHEM documents there already was a long tradition of estimating the variability of microbiological count data.

Almost a century microbiologists have been assured by statisticians that the variability of parallel counts can be modelled by the Poisson distribution, which means that the standard deviation (standard uncertainty) is the square root of the number of colonies counted. Dutifully, this concept has been repeated over and over again in standards, method protocols, and guides on counting. 95% CIs have been available in MPN tables almost from the beginning.

It also has been known since 1920s that this estimate might underestimate the uncertainty because of so called over-dispersion that may exist for many reasons.

Traditionally, however, results from microbiological analyses are presented unaccompanied by any form of uncertainty estimation. This may change although it does not seem that customers often request that information.

### Expression of uncertainty

The final stage is to multiply the global or component (combined) estimate of standard uncertainty by a chosen coverage factor  $k$ , in order to obtain an expanded uncertainty.

The expanded uncertainty  $U$  is required to provide an interval which may be expected to encompass a large fraction the distribution of values which could reasonably be attributed to the measurand, i.e. an interval within which the value of the measurand is believed to lie, with a high level of confidence. For most purposes, a coverage factor of 2 is chosen (confidence level of approximately 95%).

If requested, the uncertainty information can be reported as a confidence interval or as confidence limits. For example: Result:  $x$  (units) with a confidence interval of  $y$  to  $z$ , or,  $x$  (units) with confidence limits of  $y$  and  $z$ .

What is preferably determined is the experimental intra-laboratory standard deviation of reproducibility on the final result of the measurement.

### Bibliography

- ISO/BIPM/IEC/IFCC/IUPAC/IUPAP/OIML (1993) Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO/IEC 17025 (2005). General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO/TS19036 (2006) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.
- ISO/DIS13843 (2016). Water quality – Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods.
- ISO/DIS 29201 (2011). Water quality – The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods.
- ISO 8199 (2005). Water quality – General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture. International Organization for Standardization, Geneva.
- Forster, L.I. (2003). Measurement uncertainty in microbiology. Journal of AOAC International, 86: 1089-1094.
- Niemela, S.I. (2003) Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. MIKES J4, 2003.