



Evaluación de los indicadores de desempeño de 3M Petrifilm Staph Express (STX) frente a la norma ISO 6888-1: 2003 en el recuento de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos por contaminación artificial

Evaluation of the performance indicators of 3M Petrifilm Staph Express (STX) against the ISO 6888-1: 2003 standard in the count of *Staphylococcus aureus* in fresh cheeses by artificial contamination.

APAZA PACO, JUAN PABLO¹
 ASPILLAGA SÁNCHEZ, HILDA LUZ¹
 ESPADA SILVA, ANGÉLICA MARIA¹

FECHA DE RECEPCIÓN: 23 DE ABRIL DE 2018

FECHA DE ACEPTACIÓN: 11 DE MAYO DE 2018

Resumen

Staphylococcus aureus puede contaminar una gran gama de alimentos, siendo los quesos frescos un medio diferencial y selectivo para el desarrollo de este microorganismo, llegando a la producción de enterotoxina termoestable ocasionando una intoxicación estafilocócica transmitida por alimentos.

El empleo del método 3M Petrifilm Staph Express (STX) supone considerables ventajas frente al método convencional o de referencia, facilitando y favoreciendo muchos aspectos técnicos y económicos, dentro de ellos tenemos la optimización de tiempo en cuanto se refiere a la preparación de medios de cultivo, necesidad de equipamiento, requerimiento de infraestructura, menor requerimiento de personal y la disminuye los costos del uso de consumo eléctrico, disminuye la generación de residuos sólidos, entre otros.

La comparación entre el método alternativo frente al método convencional fue hecha

Abstract

Staphylococcus aureus can contaminate a wide range of foods, being fresh cheeses a differential and selective medium for the development of this microorganism, reaching the production of thermostable enterotoxin causing a staphylococcal intoxication transmitted by food.

The use of the 3M Petrifilm Staph Express (STX) method has considerable advantages over the conventional or reference method, facilitating and favoring many technical and economic aspects, within them we have the optimization of time as regards the preparation of culture media, need for equipment, infrastructure requirements, lower personnel requirements and decreases the costs of the use of electricity consumption, decreases the generation of solid waste, among others.

The comparison between the alternative method and the conventional method

¹ Instituto de Servicios de Laboratorios de Diagnóstico e Investigación en Salud, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2224. La Paz, Bolivia.
 Correspondencia autor: Apaza Paco Juan Pablo
 bio_juancho@hotmail.com

por medio de la contaminación artificial de una matriz libre de *S. aureus* y un recuento bajo de microbiota acompañante, donde se establecieron diferentes niveles de contaminación, evaluándose los indicadores de desempeño (exactitud relativa, precisión relativa, linealidad, curva de calibración y límite de cuantificación).

En indicador de exactitud relativa se obtuvo un 95,6% de recuperación para el nivel más bajo (aproximadamente 8 UFC/g) y 98,7% de recuperación para el nivel de contaminación más alto (aproximadamente 5300 UFC/g), teniendo un rango de 70 a 120% de aceptación. Para la precisión relativa se calcularon la RSD de todos los niveles ensayados, obteniéndose datos que aceptan la precisión relativa del método de placa seca rehidratable porque los valores fueron menores al RSD teórico calculado. El límite de detección fue ensayado con <10UFC/g obteniéndose un CV de 1,16%.

Por los resultados obtenidos podemos concluir que el método 3M Petrifilm Staph Express (STX) cumple con los indicadores de desempeño frente a la norma ISO 6888-1:2003.

PALABRAS CLAVE

S. aureus, queso fresco, placa seca rehidratable, contaminación artificial.

was made by means of the artificial contamination of a free matrix of *S. aureus* and a low accompanying microbiota count, where different levels of contamination were established, evaluating the performance indicators (relative accuracy, relative precision, linearity, calibration curve and limit of quantification).

In the relative accuracy indicator, 95.6% recovery was obtained for the lowest level (approximately 8 CFU / g) and 98.7% recovery for the highest level of contamination (approximately 5300 CFU / g), with a range of 70 to 120% acceptance. For the relative precision, the RSD of all the tested levels was calculated, obtaining data that accept the relative accuracy of the dry rehydratable plate method because the values were lower than the calculated theoretical RSD. The limit of detection was tested with <10 CFU / g, obtaining a CV of 1.16%.

Based on the results obtained, we can conclude that the 3M Petrifilm Staph Express (STX) method complies with the performance indicators against the ISO 6888-1:2003 standard.

KEY WORDS

S. aureus, fresh cheese, rehydratable dry plate, artificial contamination.

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus puede contaminar una gran gama de alimentos, llegando ocasionar un cuadro de intoxicación alimentaria que resulta tras la ingestión de enterotoxinas termoestables preformadas que son generadas por una cepa toxigénica de *Staphylococcus aureus* que contaminó y se desarrolló en un alimento. La incidencia es desconocida pero es probablemente una de las causas de intoxicación transmitida por alimentos. Entre los alimentos más frecuentemente se encuentran: quesos frescos, huevos, pollo, cremas heladas (Bird *et al.*, 2014). A nivel Latinoamérica, según datos recogidos del Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las ETA, durante el período 2012 -2016 han sido declarados 16 brotes de intoxicación estafilocócica, con un total de 430 afectados sin fallecimientos. En 5 brotes se identificaron lácteos como alimento responsable, siendo carnes rojas y aves los restantes. Ocupa un papel destacado como agente etiológico de una de las gastroenteritis por intoxicación por consumo de alimentos contaminados. Esta afección se conoce como intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE) (Bird *et al.*, 2013). *S. aureus* es la especie más característica del

género. Entre sus numerosos factores de virulencia se encuentran las enterotoxinas estafilocócicas (SE).

El empleo de las placas 3M Petrifilm Staph Express (STX) presenta ciertas ventajas frente al método convencional o de referencia, facilitando y favoreciendo muchos aspectos técnicos y económicos, dentro de ellos tenemos la optimización de tiempo en cuanto se refiere a la preparación de medios de cultivo, uso de autoclave, baño de agua, material fungible, también disminuye los costos del consumo de energía eléctrica, entre otros.

En el presente trabajo se evaluaron los siguientes indicadores de desempeño (*límite de cuantificación, exactitud relativa, precisión relativa, linealidad y curva de calibración*) considerada según ISO/TR 13843 como una validación interna o verificación por parte del laboratorio de control que va a utilizar el método alternativo, consiste básicamente en comprobar que el laboratorio es capaz de cumplir con los requisitos de funcionamiento del método previamente establecidos en las condiciones habituales de trabajo. Para poder realizar lo descrito anteriormente, se ensayaron matrices con diferentes niveles de contaminación artificial con el analito de interés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Matriz contaminada artificialmente

Se establecieron siete niveles de contaminación con la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29325 en la matriz libre del analito de interés. Para ello se procedió a la siembra de la cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* en medio BHI, se incubó por 24 horas a 35°C, obteniendo un cultivo saturado, en continuidad se realizó diluciones seriadas hasta tener un recuento de 30 a 300 UFC/mL, conociendo la población aproximada se realizó el ajuste para poder obtener recuentos descritos en la tabla 1 según AOAC (2002).

Tabla 1. Niveles de contaminación artificial con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

NIVEL	CONTAMINACION ARTIFICIAL	FORTIFICACIÓN (INTERFERENTES)
0	0 UFC/g	70 UFC/g
1	8 UFC/g	70 UFC/g
2	20 UFC/g	70 UFC/g
3	34 UFC/g	70 UFC/g
4	90 UFC/g	70 UFC/g
5	112 UFC/g	70 UFC/g
6	270 UFC/g	70 UFC/g
7	1020 UFC/g	70 UFC/g

Recuento de *Staphylococcus aureus* de acuerdo a la norma ISO 6888-1.

En una bolsa stomacher estéril, se procedió a pesar 25g de muestra, se realizaron diluciones seriadas con agua peptonada llegando hasta un factor de dilución de 10^{-2} . Hechas las diluciones se procedió a inocular la dilución 10^{-2} un volumen de 0,1mL por duplicado sobre la superficie de Agar Baird Parker, se distribuyó el inóculo con la ayuda de un asa de Drigalsky, posteriormente se incubaron las placas a 35°C durante 48hrs. Pasado este tiempo las colonias características de *Staphylococcus aureus* fueron sometidas a confirmación con la prueba de la coagulasa y DNasa.

Para realizar la prueba confirmatoria de la coagulasa se deben inocular cinco colonias típicas y cinco colonias atípicas en caldo BHI, incubarlo a 35°C por 24hrs. al cabo de este tiempo en un tubo estéril se pusieron 0,3mL de plasma y 0,1mL de cultivo, se homogenizo y se incubo a 35°C por 6 horas, se realizaba la inspección cada 2 hrs.

Recuento de *Staphylococcus aureus* por 3M Petrifilm Staph Express (STX)

En una bolsa de stomacher estéril, se pesaron 25 gramos de la muestra, posteriormente se agregaron 225 ml de agua peptonada obteniendo un factor de dilución de 10^{-1} , posteriormente se ubicaron las placas en una superficie plana y lisa. Se elevó la lámina superior y se inóculo 1mL de la dilución en el centro de la placa Staph Express sin hacer burbujas, se aplicó el esparcidor plano en el centro de la placa para distribuir la muestra de manera uniforme, finalmente se incubaron las placas a 35°C por 24 horas donde se puede colocar hasta 20 placas Staph Express una sobre otra.

Transcurrido el tiempo de incubación se contaron las colonias rojo-violetas. No se contó las colonias azules o verdosas.

Exactitud relativa

La exactitud, de los métodos se determinó mediante el porcentaje de recuperación, es decir, mediante el número de microorganismos que se cuentan en placas de Agar Baird Parker y 3M Petrifilm Staph Express (STX) comparando los recuentos obtenidos por ambos métodos, para ello se emplea la siguiente formula:

$$\text{Recuperación\%} = \frac{\text{Recuento obtenido}}{\text{Valor de referencia}} * 100 =$$

Se calculó la recuperación de cada muestra analizada, empleando el promedio de los duplicados, y se obtuvo la recuperación total. Para que el método se considere exacto ha de cumplir que el porcentaje de recuperación se encuentre entre 70 y 120%.

Precisión relativa

A partir de las matrices contaminadas se definieron 9 niveles de concentración, cada nivel contaba con 6 repeticiones en condiciones de reproducibilidad y se estimó la desviación estándar de reproducibilidad (RSD), comparándolo con el del método de referencia o bien con el valor RSD teórico. La precisión del método es aceptable si es inferior o no se desvía en más de un 30% de la del método de referencia o la RSD teórica para cada nivel de inóculo (ISO/TS 19036:2002).

$$RSD \text{ real} = \frac{S}{X}$$

$$RSD \text{ teórico} = \frac{1}{\sqrt{X}}$$

Linealidad y curva de calibración

Para determinar la linealidad se trabajó con 6 niveles de contaminación artificial del analito (0 UFC/g; 8 UFC/g; 34 UFC/g; 100 UFC/g; 1020 UFC/g; 5300 UFC/g) los ensayos fueron por duplicado, se ensayaron los tres métodos en paralelo para establecer su linealidad.

Para constituir una curva de calibración se trabajó en base a los datos obtenidos en el ensayo de linealidad donde se representara un gráfico donde el eje Y se encontrarán los resultados obtenidos con el método alternativo (en valor logarítmico) y en el eje X el valor obtenido con el método de referencia (o con el material de referencia utilizado). En base a este gráfico se obtiene una estimación del método de regresión.

A partir de los mismos se hizo un estudio de regresión ($Y=a+bx$) en el que no solo debemos evaluar el coeficiente de correlación (r) sino que se debe verificar que las hipótesis planteada en el trabajo se cumple (ejm.: los valores de la recta están dentro de un intervalo de confianza del 95%) evaluando de este modo la linealidad o defecto de ajuste (Aptitud del método para dar resultados que están en proporción con la cantidad de microorganismos presentes en la muestra).

Límite de cuantificación

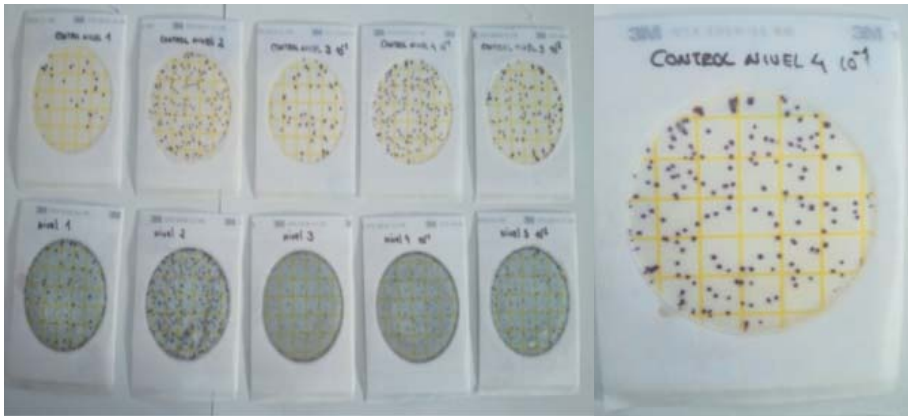
El límite de cuantificación se obtendrá a través del nivel crítico (menor cantidad que puede ser detectada (no nula) pero no cuantificada como un valor exacto. Para ello se seleccionaron tres niveles de microorganismos (mínimo, medio y alto) (0 UFC/g; 8 UFC/g; 30 UFC/g; 300 UFC/g) y se ensayaron cada uno de los niveles por seis oportunidades. Como dato importante, indicar que la AOAC define el límite de cuantificación como aquella en el que el coeficiente de variación (S/X) debe ser inferior al 10%. El límite de cuantificación puede estimarse mediante el análisis de diluciones (1:2 a \leq 1:10) de bajas concentraciones de microorganismos, según AOAC equivale al nivel donde el coeficiente de variación es inferior al 10% ($CV = Sr/X < 10$).

RESULTADOS

Matriz contaminada artificialmente

En la figura 1, se puede observar los niveles de contaminación artificial que se realizaron para poder llevar adelante la evaluación de los indicadores de desempeño, dichos niveles contaban además con los microorganismos interferentes anteriormente citados, en la fila superior se observan los controles de los niveles ensayados y en la fila inferior se observan los niveles con la matriz contaminada.

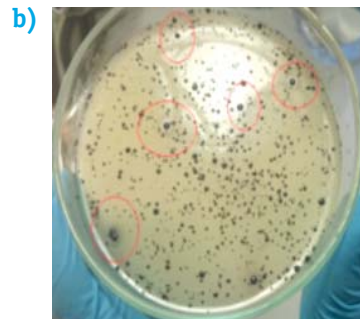
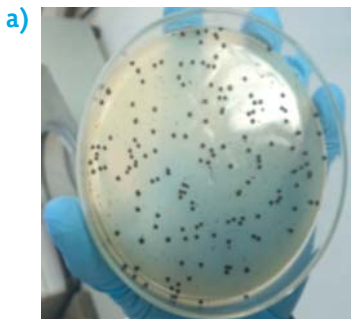
Figura 1. Ensayo de los niveles: nivel 1 (20 UFC/g); nivel 2 (100 UFC/g); nivel 3 (300 UCF/g); nivel 4 (1020 UFC/g) y nivel 5 (5300 UFC/g) método 3M Petrifilm Staph Express (STX).



En paralelo se inocularon las muestras fortificadas en medio Baird Parker como establece la norma ISO 6888-1:2003 (Figura 2); en las mismas se observó el desarrollo de colonias típicas y atípicas que después fueron confirmadas por la prueba de la coagulasa y DNasa.

Figura 2. Ensayo de los niveles: nivel 1 (20 UFC/g); nivel 2 (100 UFC/g); nivel 3 (300 UCF/g); nivel 4 (1020 UFC/g) y nivel 5 (5300 UFC/g) de acuerdo a la ISO 6888-1:2003 medio Baird Parker.

a) Colonias atípicas de *S. aureus*. b) Colonias típicas de *S. aureus*.



Exactitud relativa

Como se puede observar en la tabla 2, la exactitud relativa que muestra el método de placa seca rehidratable que se representa por el porcentaje de recuperación, que fue calculado para cada nivel.

Tabla2.- Análisis de la exactitud relativa del método de placa seca rehidratable a distintos niveles de contaminación artificial.

NIVEL	MEDIA \pm SD	% RECUPERACIÓN	VALORES ESPERADOS		
			NIVEL	UFC/g	log UFC/g
1	0,86 \pm 0,0476	95,60%	1	8	0,90
2	1,27 \pm 0,0295	97,90%	2	20	1,30
3	1,45 \pm 0,0164	95,00%	3	34	1,53
4	2,00 \pm 0,0235	97,80%	4	112	2,05
5	2,43 \pm 0,0098	99,40%	5	278	2,44
6	2,49 \pm 0,0186	98,10%	6	350	2,54
7	2,96 \pm 0,0172	98,50%	7	1020	3,01
8	3,68 \pm 0,0288	98,70%	8	5300	3,72

Como podemos en la Tabla 2, Se obtuvo un 95,6% de recuperación para el nivel más bajo (aproximadamente 8 UFC/g) y 98,7% de recuperación para el nivel de contaminación más alto (aproximadamente 5300 UFC/g), teniendo como promedio un valor de 97.6% de exactitud relativa.

Precisión relativa

Se estimó la desviación estándar de reproducibilidad (RSD), dicho valor se comparó con el RSD teórico. La precisión relativa del método es aceptable si es inferior o no se desvía en más de un 30% de la del método de referencia o la RSD teórica para cada nivel de inóculo (ISO/TS 19036:200). Como se puede observar la tabla 3, se calcularon la RSD de todos los niveles ensayados, obteniéndose datos que aceptan la precisión relativa del método de placa seca rehidratable porque los valores menores al RSD teórico calculado.

Tabla 3.- Análisis de la precisión relativa del método de placa seca rehidratable a distintos niveles de contaminación artificial (Microsoft office-Excel).

NIVEL	MEDIA \pm SD	RSDt	RSDcal
1	0,866 \pm 0,0127	1,0523	0,01467
2	1,27 \pm 0,0048	0,8767	0,00378
3	1,45 \pm 0,0013	0,8081	0,00090
4	2,00 \pm 0,0023	0,7153	0,00115
5	2,43 \pm 0,0003	0,6986	0,00012
6	2,49 \pm 0,0019	0,6405	0,00076
7	2,96 \pm 0,0013	0,5765	0,00044
8	3,68 \pm 0,0034	0,5182	0,00092

Linealidad y curva de calibración

La figura 3, muestra: a) la linealidad del método placa seca rehidratable y b) curva de calibración en relación al método de referencia, obteniendo un $R^2 = 0,9997$ en la evaluación de la linealidad y un $R^2 = 0,996$ para la curva de calibración. Estas graficas se construyeron con los recuentos de 8 niveles, teniendo concentraciones desde 0 UFC/g hasta los 5300 UFC/g dichos valores en UFC/g fueron transformados en valores de log de base 10, para poder realizar el análisis estadístico de las tres metodologías.

Figura 3.- Correlación del recuento de *Staphylococcus aureus*: niveles de contaminación artificial Vs control. a) Linealidad del método placa seca rehidratable y b) Curva de calibración.

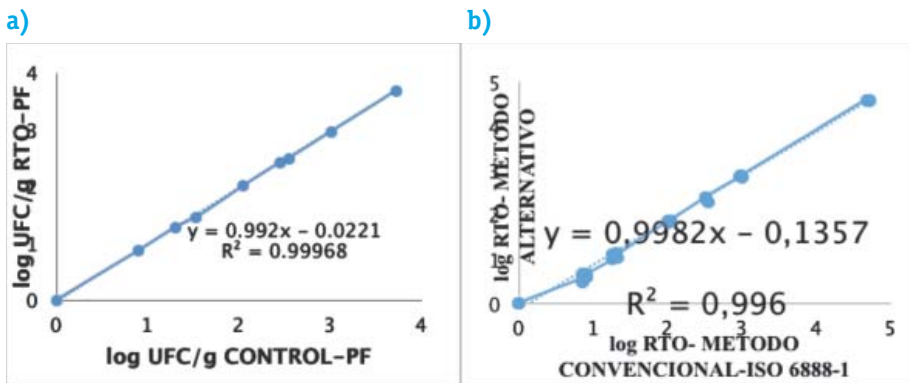


Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) de doble vía: recuento por diferentes métodos versus nivel de concentración de *Staphylococcus aureus* (Microsoft office-Excel)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Niveles	49,953637	7	7,13623386	12,6367661	2,8814E-06
Métodos	36,0347329	3	12,0115776	21,2699724	1,4355E-06
Error	11,8591188	21	0,56471994		
Total	97,8474888	31			

En la tabla 4, se muestra los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de doble vía, niveles de concentración de *Staphylococcus aureus* y los métodos de recuento, donde se obtuvo un $P < 0,05$ para ambas vías, donde pone de manifiesto que no existe diferencia estadísticamente significativa

Límite de cuantificación

Se debe mencionar que la AOAC define el límite de cuantificación como aquella en el que el coeficiente de variación (S/X) es inferior al 10%. Al observar la tabla 13, se muestra que el método placa seca rehidratable presenta un CV del 1,16%.

Tabla 5.- Análisis del límite de cuantificación del método de placa seca rehidratable

	MÉTODO 3M PETRIFILM (STX)	MÉTODO ISO 6888-1
	0,9	0,7
	0,78	0,42
	0,85	0,7
	0,9	0,42
	0,9	0,7
	0,85	0,89
Promedio	0,86	0,64
SD	0,01	0,17
CV%	1,16	26,5625

Tabla 6.- Análisis de varianza (ANOVA) de una vía: límite de cuantificación versus método de recuento.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	0,35287778	2	0,17643889	9,52179649	0,00214003
Dentro de los grupos	0,27795	15	0,01853		
Total	0,63082778	17			

En la tabla 6, se muestra el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, donde se obtuvo un $P < 0,05$ donde pone de manifiesto que si existe diferencia estadísticamente significativa, resultado que concuerda con el cálculo del coeficiente de variación.

DISCUSIÓN

El recuento en placa seca rehidratable consiste en contar solamente las colonias violetas. Los fabricantes recomiendan un rango < 100 UFC/g o mL, si el recuento supera las 150 UFC/g o mL de desarrollo debe ser reportado como muchas colonias por contar (MCP), es por ello que se realizaron diluciones de los niveles 3; 4; y 5 para poder estar dentro de ese límite o también se puede optar por contar las colonias presentes en una cuadrícula y multiplicarlo por 30, esto para poder tener un estimado o realizar más diluciones. En cambio por el método convencional se maneja un intervalo de recuento que oscila entre 25 a 250 UFC/g o mL.

Se obtuvo en promedio un valor de 97.6%, siendo aceptable por encontrarse dentro del rango de 70-120%. Porcentajes similares se obtuvieron cuando Nogueira (2010) donde realizó la comparación entre el medio Baird Parker, agar plasma fibrinógeno de conejo y placa seca rehidratable para el recuento de *Staphylococcus aureus* en leche cruda. Sin embargo, el estu-

dio realizado por Nyachuba (2007) muestra un porcentaje de recuperación de 82,6% para el método de placa seca rehidratable y 92,5% para el método referencia ISO. La razón por la cual se maneja la exactitud en porcentaje, se debe porque no podemos manejar a los microorganismos como analitos químicos, su variación en número se puede deber a muchos factores, por un lado relacionados con la matriz a ensayar y por el otro lado las condiciones de laboratorio para poder realizar el recuento de este microorganismo en una matriz dada.

La precisión relativa del método del método es aceptable si es inferior o no se desvía en más de un 30% de la del método de referencia o la RSD teórica para cada nivel de inóculo (ISO/TS 19036:200). En la validación realizada el instituto científico de higiene y análisis (ISHA) en Marzo del 2015 se obtuvieron un RSD de 0.116 en método de referencia y un RSD de 0,074 para el método de placa seca rehidratable, siguiendo la normativa ISO 16140/A1 (2011). Los valores mencionados se relacionan con lo obtenido en el presente trabajo.

Los valores en UFC/g fueron transformados en valores de log de base 10, para poder realizar el análisis estadístico de las tres metodologías. Resultados similares se obtuvieron en la validación de marzo del 2015 por la ISHA, obteniendo la certificación por la AFNOR (NF VALIDATION 16140™), sin embargo en ese estudio no se trabajó con una sola matriz, se validó el método con cinco matrices diferentes como lo indica la ISO: 16140/A1 (2011).

El análisis de varianza (ANOVA) de doble vía, niveles de concentración de *Staphylococcus aureus* y los métodos de recuento, donde se obtuvo un $P < 0,05$ para ambas vías, Nogueira (2010) obtuvo valores de $P < 0,05$ en el análisis estadístico de las pruebas que desarrollo comparando el método de placa seca rehidratable frente al medio Baird Parker y agar plasma fibrinógeno de conejo, la mejoría que presenta este método de recuento es la incorporación de un cromógeno que evidencia la presencia y facilita el recuento de las colonias de *Staphylococcus coagulasa* positivos.

Se debe mencionar que la AOAC define el límite de cuantificación como aquella en el que el coeficiente de variación (S/X) es inferior al 10%. Sin embargo podemos observar que los valores CV para la NB e ISO no serían aceptados, esto se debe porque se ensayó un nivel de < 10 UFC /g. se debe de tomar en cuenta que el inóculo en la NB de 1mL esta fraccionada en tres (0.3mL; 0,3mL y 0,4mL) y en el caso de norma ISO, el volumen de inóculo es de 0,1mL. (Sí por ejemplo tenemos una matriz con 100 UFC/g, al hacer la dilución 10^{-1} solo se tendrá 10 UFC/g y de acuerdo a la norma ISO se siembre 0,1mL por duplicado, en este caso se tendría en la placa tendría que esperar el desarrollo de una colonia de *Staphylococcus aureus*, recordando que las matrices alimenticias cuentan con una microbiota variada, sin embargo el inóculo de la muestra en el método de placa seca rehidratable es de 1mL evitándose este fraccionamiento que conlleva a ser un punto crítico cuando no se cuenta con personal calificado.

CONCLUSIONES

Se comparó el desempeño del método 3M Petrifilm Staph Express (STX) frente al cultivo referido por la norma ISO 6888-1:2003 para el recuento *Staphylococcus aureus* en quesos frescos de elaboración artesanal por medio del ensayo de niveles de contaminación artificial. De acuerdo al análisis estadístico se obtuvo un $P < 0,05$ que evidencia que sí existe diferencia estadísticamente significativa.

Se determinaron los indicadores de desempeño por medio de la contaminación artificial de la matriz seleccionada, obteniéndose una exactitud relativa promedio del 97,6%, para la linealidad y curva de calibración se calculó un $R^2 = 0,9997$ y $0,996$ respectivamente, de acuerdo al análisis de varianza de doble vía se obtuvo un $P < 0,05$ concluyendo que sí existe diferencia estadísticamente significativa; el límite de cuantificación que se estableció fue de 1,16%, valor que fue aceptado por ser $<$ al 10% CV.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa 3M por proporcionarnos los insumos y al instituto SELADIS por brindarnos los ambientes para realizar el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Ruaro, Andrighetto G, Sandra Torriani, Angiolella Lombardi; 2013. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. *Food Microbiology* 34:10-11.
- AOAC International. 2002. Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis.
- Asociación Española de Normalización y certificación. 2004. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos UNE-EN ISO 4833: AENOR
- Danish Institute for food and Veterinary Research. NORDVAL 2004. Protocol for the validation of alternative microbiological methods. De Pasquale, I., Di Cagno, R., Buchin, S., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2014b. Microbial ecology dynamics reveal a succession in the core microbiota involved in the ripening of pasta filata Caciocavallo Pugliese cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6243-6255.
- International Organization for Standardization. 2003. International Standard ISO 16140. Microbiology of food and animal feeding stuffs Protocol for the validation of alternative methods.
- International Standardization Organization. 2006. Microbiology of food and animal feedstuff- Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. ISO/TS 19036.
- Karen m. Silbernagel, robert p. Jechorek, and charles n. Carver. 2003. 3M Petrifilm Staph Express Count Plate Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Types of Processed and Prepared Foods: Collaborative Study Journal of AOAC international VOL. 86:5-20.
- Loiane Mayra Jacó de SOUZA, Anna Carolina COSTA, Luis Augusto Nero, Emanuel Pereira COUTO, Márcia de Aguiar FERREIRA; 2015. Evaluation of Petrifilm™ system compared 78 with traditional methodology in count of indicators of sanitary-hygienic quality and pathogenic microorganisms in sheep milk. *Food Sci. Technol, Campinas*, 35(2): 375-379.
- Naber CK. 2009. *Staphylococcus aureus* bacteremia: Epidemiology, pathophysiology, and management strategies. *Clin Infect Dis.* 48 (4):s231-s237. 79.
- Ruiz-Quezada SL, Orozco Anguiano AE, Martínez Acosta DG, López Sandoval MG, Rodríguez M. OA, Flores Calzada SC, Salazar García PR. 2010. Estudio piloto sobre la frecuencia en chorizo de *Staphylococcus aureus* en la zona metropolitana de Guadalajara. *RESPYN.* 9(13):1-3.