

**EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO DEL PETRIFILM™ STAPH EXPRESS 3M™
FRENTE AL METODO TRADICIONAL EMPLEADO PARA LA IDENTIFICACION DE
Staphylococcus aureus COAGULASA POSITIVA EN FRIGOCOLANTA®, SANTA
ROSA DE OSOS, ANTIOQUIA**

EDWARD FERNANDO CAPACHO HERNANDEZ
Estudiante de Décimo Semestre
Programa de Microbiología

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
COLOMBIA
2016

**EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO DEL PETRIFILM™ STAPH EXPRESS 3M™
FRENTE AL METODO TRADICIONAL EMPLEADO PARA LA IDENTIFICACION DE
Staphylococcus aureus COAGULASA POSITIVA EN FRIGOCOLANTA®, SANTA
ROSA DE OSOS, ANTIOQUIA**

EDWARD FERNANDO CAPACHO HERNANDEZ
Estudiante de Décimo Semestre
Programa de Microbiología

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de
MICROBIÓLOGO

Asesor
CLAUDIA MARINA CLAVIJO OLMOS, Ph.D.

Asesor externo
SANDRA MILENA MÚNERA PEÑA
COORDINADORA DE CONTROL Y CALIDAD – FRIGOCOLANTA – SANTA ROSA DE OSOS
NATALY BLANDÓN AGUIRRE
BACTERIÓLOGA Y LABORATORISTA CLÍNICA – FRIGOCOLANTA – SANTA ROSA DE OSOS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
COLOMBIA
2016

Nota de aceptación

Firma Del Jurado

Firma Del Jurado

Pamplona, 20 de junio del 2016

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi guía, iluminándome el camino; con su bendición.

A mis padres y hermanos por creer en mí y darme todo su apoyo, en especial a mi madre Nubia Hernández, quien admiró por encima de todo y es un eslabón fundamental en mi vida; Gracias por brindarme su amor incondicional.

A mi querida Universidad, mi departamento de Microbiología, y Frigocolanta por permitir mi desarrollo personal y profesional.

A Nataly Blandón, por su valiosa colaboración; al igual que el personal de Control Calidad de Frigocolanta ; a la profesora Claudia Clavijo, quien me guió en cada uno de los procedimientos desarrollados y por ultimo agradecerle al departamento de Microbiología.

Edward Fernando capacho

Aprendí que no se puede dar marcha atrás, que la esencia de la vida es ir hacia adelante. La vida, en realidad, es una calle de sentido único.

Agatha Christie (1891-1976).

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO	13
1.1. Objetivo general	13
1.2. Objetivos específicos	13
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. MARCO DE REFERENCIA	15
3.1. Bases legales	15
3.2. Bases teóricas	16
3.2.1. Caracterización de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.2.2. Epidemiología	18
3.2.3. Parámetros Frigocolanta®	18
3.2.4. Requisitos para aplicar métodos alternativos	20
4. METODOLOGÍA	24
4.1. Muestreo	24
4.2. Preparación de inóculos	24
4.3. FASE I. “ALIMENTOS NATURALMENTE CONTAMINADOS”	25
4.3.1. Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva por método tradicional (agar Baird Parker)	25
4.3.2. Prueba de la presencia de la enzima coagulasa	25
4.3.3. Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva por Petrifilm™ Staph Express (3M™)	26
4.3.4. Disco Staph Express Petrifilm	26
4.4. FASE II “CONTAMINACIÓN ARTIFICIAL”	26

4.4.1.	Controles.....	26
4.4.2.	Contaminación de las muestras	27
4.5.	Modelo estadístico	27
4.5.1.	Métodos cualitativos:.....	27
4.5.2.	Método estadístico descriptivo.	28
5.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	29
6.	RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	30
6.1.	FASE I. “ALIMENTOS NATURALMENTE CONTAMINADOS”	30
6.2.	FASE II “CONTAMINACIÓN ARTIFICIAL”	36
7.	CONCLUSIONES.	42
9.	BIBLIOGRAFIA.	44
10.	ANEXOS.....	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Normativa referente	15
Tabla 2. Parámetros de crecimiento de <i>S. aureus</i>	17
Tabla 3. Parámetros internos microbiológicos de Frigocolanta.	19
Tabla 4. Protocolo para la evaluación de desempeño de método alternativo	21
Tabla 5. Prueba McNemar.	27
Tabla 6. Estadística de regresión lineal.	31
Tabla 7. Diferencias logaritmos entre recuentos de los métodos.	32
Tabla 8. Comparación de los métodos.	34
Tabla 9. Análisis descriptivo	38
Tabla 10. Nivel de contaminación media 10^2 (10-100 ufc).	48
Tabla 11. Nivel de contaminación baja 10^1 (1-10 ufc).	48

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Control positivo y negativo.	31
Imagen 2. Sangre bovina.	32
Imagen 3. Evidencia grafica de análisis a matrices de la competencia.	33
Imagen 4. Verificación de las matrices a contaminar.	37
Imagen 5. Control de los inóculos 10^8 , 10^2 y 10^1 ufc/ml.	37
Imagen 6. Gráfica del nivel de contaminación media.	40
Imagen 7. Gráfica del nivel de contaminación baja.	41

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Eficacia relativa (AC).....	28
Ecuación 2. Sensibilidad relativa (SE)	28
Ecuación 3. Especificidad relativa (SP).....	28

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Tablas de resultados de la contaminación artificial.	48
Anexo 2. Registro de los medios de cultivo utilizados.....	49
Anexo 3. Lista de equipos utilizados.	49
Anexo 4. Analistas que participaron en la evaluación de desempeño	49

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo está enfocado hacia la evaluación de desempeño del Petrifilm™ Staph Express (STX) para la identificación y enumeración de **S. aureus** coagulasa positiva, es por eso que se hace necesario hablar de la verificación como punto importante en el análisis microbiológicos de **S. aureus** coagulasa positiva, donde su principal objetivo es proveer evidencias de la exactitud y confiabilidad del método alternativo con fines de su posible cambio para el laboratorio de microbiología - Frigocolanta®.

De igual forma; los análisis microbiológicos presentados son la herramienta para determinar el cumplimiento de los estándares microbiológicos llevados a cabo en el control de la calidad y procesos en la industria de alimentos, al igual que la verificación de métodos alternativos. Además de ser usados y requeridos por entes gubernamentales para asegurar el cumplimiento de los requerimientos legales en la industria.

Ya que, la prevalencia de este microorganismo en la planta Frigocolanta® es baja. Su protocolo para la enumeración e identificación de **S. aureus** coagulasa positiva se realiza una vez por semana de forma aleatoria al muestreo programado semanal. Tomando un día diferente cada semana con el fin de abarcar todos los cortes empacados a granel, al vacío y productos cárnicos comestibles de las especies porcino y bovinos (mayor y menor)

Dado que, el empleo de métodos alternativos en laboratorios de microbiología, supone grandes ventajas frente a los métodos convencionales o de referencia, aspectos como la rapidez, automatización, interpretación de resultados, facilidad de uso, etc. Hacen que estos métodos sean cada vez más utilizados, y adecuados a las necesidades de cada planta del grupo Colanta®.

En la microbiología moderna existen nuevos métodos para la detección y enumeración de microorganismos en alimentos, es el caso del sistema Petrifilm™, es bien sabido que tienen una mayor facilidad de uso y son confiables.

Como parte de la evaluación de desempeño del Petrifil™ Stamp Express (STX). Se hace necesaria una verificación del métodos alternativo frente al método de referencia. Los cuales son métodos de ensayos, que aseguren el cumplimiento de los requisitos para su posterior validación.

Este proyecto busca evaluar parámetros de desempeño del método para la identificación, cuantificación y confirmación de **S. aureus** coagulasa positiva en placas de Petrifilm™ STX en diferentes matrices cárnicas. Al igual que determinar la incertidumbre del método frente al de referencia. Esto se logra con la evaluación en dos fases; Fase I: “Alimentos naturalmente Contaminados” y la Fase II: “Contaminación artificial”.

1. OBJETIVO

1.1. Objetivo general

Evaluar el desempeño del Petrifilm™ Staph Express (3M™) para realizar el recuento de ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positiva en matrices cárnicas de especies de Bovino mayor, menor y porcinos además de los productos cárnicos comestibles; comparado con la técnica tradicional de recuento en placa en agar Baird Parker.

1.2. Objetivos específicos

- Comparar cualitativamente el método alternativo (Petrifilm™) frente a el método de referencia para el análisis de ***S. aureus*** coagulasa positiva en matrices cárnicas de Frigocolanta®.
- Evaluar el método Petrifilm Staph Express con matrices naturalmente contaminadas, de la competencia de Frigocolanta®.
- Evaluar los métodos de ensayo mediante una contaminación artificial en matrices cárnicas únicas, usando la cepas ATCC de ***S. aureus*** número 25923; con niveles de concentración media (10^2) y baja (10^1).

2. JUSTIFICACIÓN

Realizar un análisis microbiológico suele ser una labor que consume gran cantidad de tiempo y trabajo, es así que cada vez más se han ido desarrollado, modificado o diseñado métodos más rápidos y sencillos para un fin común, en la industria alimentaria el validar métodos alternativos va en furor ya que un resultado a tiempo permite la toma de decisión oportuna para así evitar un daño a la salud pública.

Con fines de cambio de metodología para la identificación y enumeración de ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positiva, en Frigocolanta. Uno de los parámetros importantes para una “validación completa” del método alternativo es la “evaluación de desempeño del método alternativo” frente al método referente.

Así bien; la importancia de realizar un estudio comparativo entre la placa Petrifilm™ Staph Express (STX), y placa de recuento en agar Baird Parker busca establecer la diferencias y similitudes competitivas que presentan los métodos o en otras palabra las ventajas y desventajas que presentan los métodos.

Además; para Frigocolanta® surge la necesidad de implementar o actualizar metodologías que le faciliten la obtención de resultados en tiempos cortos, que garanticen su precisión y exactitud, para asegurarle al consumidor “alimentos inocuos”.

Para este fin, se realizó la comparación de productos comerciales para el análisis microbiológico de ***S. aureus*** coagulasa positiva, además de las regulaciones nacionales y referencias internacionales e internas de Frigocolanta para determinar el nivel competitivo del método alternativo en matrices cárnicas.

3. MARCO DE REFERENCIA.

3.1. Bases legales.

En la tabla 1 se especifican las normas internacionales que apoyan jurídicamente el presente trabajo.

Tabla 1. Normativa referente.

NORMA	DESCRIPCIÓN
ISO 17025:2005	Establece los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración, para comprobar la calidad de sus operaciones, que son competentes técnicamente y capaces de generar resultados válidos (ISO 17050, 2005).
ISO 16140: 2003	Define el principio general y el protocolo técnico para la validación de métodos alternativos en el campo del análisis microbiológico de alimentos, alimentos para animales y muestras medio ambientales y veterinarias para la validación de métodos alternativos que se pueden utilizar, en particular, en el marco del control oficial, y la aceptación internacional de los resultados obtenidos por el método alternativo (ISO 16140:2003, 2011).
AOAC Método Oficial 2003.11	Método oficial para recuento y confirmación de <i>Staphylococcus aureus</i> en Petrifilm™. En cárnicos, mariscos y aves (AOAC , 2007).
AOAC Método Oficial 975.55	Especifica el método de recuento en Placa para la enumeración de estafilococos coagulasa-positiva en alimentos. (AOAC 975.55, 1976).

Fuente: Autor.

3.2. Bases teóricas

3.2.1. Caracterización de *Staphylococcus aureus*.

Taxonomía

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales,

Familia: Microcococeae

Género: *Staphylococcus*

Especie: ***Staphylococcus aureus***

Este microorganismo tiene cerca de 38 especies; Y solamente 18 especies de *Staphylococcus*, han sido reportadas en el INS, por ser de importancia en alimentos, siendo ***S. aureus*** la más relevante y siendo ésta indicadora de contaminación por manipulación inadecuada (Fuentes y Moreno. 2011).

Los estafilococos son un amplio grupo de bacterias Gram-positivas, cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras. Se caracterizan porque se dividen en agrupaciones que asemejan racimos de uva (Zendejas. *et al* 2014). No esporulados e inmóvil. Son organotrofos, catalasa positiva, con un contenido de G+C en la composición del ADN de 30 a 40%. Por lo general, las cepas productoras de coagulasa son termonucleasa positiva. Es una bacteria ubicua y patógena que puede causar intoxicación alimentaria.

Es importante resaltar que existen cepas coagulasa negativas que pueden ser enterotoxigénicas (Fuentes y Moreno. 2011). Su fisiología radica en que esta es una bacteria mésófilo aerobia facultativa capaz de crecer en amplios rangos de pH y A_w . Ver tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de crecimiento de *S. aureus*.

Parámetros	Optimo	Rango
Temperatura °C	37	7- 48
pH	6-7	4-10
A_w	0,98	0,83-0,99
NaCl	0	0-20
Atmosfera	Aerobio facultativo	

Tomada de: (Fuentes y Moreno. 2011).

S. aureus es la principal especie causante de intoxicaciones estafilocócicas causadas por el consumo de alimentos contaminados; *S. aureus* es capaz de producir una gran variedad de enterotoxinas, sin embargo el 95% de los casos de intoxicaciones han sido producidas por las enterotoxinas clásicas A, B, C, D y E (Zendejas. *Et al* 2014).

Ahora bien; el FDA, establece que una cantidad de ***Staphylococcus aureus*** en proporción de 10^5 UFC/g de alimento, provoca intoxicaciones y que un nivel basal de aproximadamente un nanogramo de toxina estafilocócica por gramo de alimento (FDA, 2003); (Cuellar. 2015).

Otro factor importante; es su resistencia a la congelación y a la descongelación, se inhibe a temperaturas inferiores a 5°C y no produce la toxina por debajo de 10°C. Este microorganismo se inactiva a temperaturas de cocción (> 65°C). ***S. aureus*** coagulasa positiva presenta un *D*60 entre 0,43 y 8,0 minutos pero depende del tipo de carne (Fuentes y Moreno. 2011).

Ahora bien, teóricamente se conoce que las carnes rojas son uno de los alimentos más perecederos debido a su alta composición de proteínas, vitaminas, calcio, potasio, zinc, etc. pH entre 5-7 y A_w de 0,99. Factores que influyen en el crecimiento para la mayoría de los microorganismos (Rojas Y Clavijo. 2010).

Un ejemplo es la carne de res la cual tiene una cantidad de proteínas del 20,5 %, lípidos de 0,2 %, minerales de 1,1 % y humedad de 78,2% (Valle. 2013).

3.2.2. Epidemiología.

En Colombia, para el 2009 se presentó 899 brotes por ETAs (Sivigila), de los cuales solo en el 56% se identificó el agente patógeno, el 18,4% corresponde a la presencia de ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positiva, tanto en alimentos (79%), como en muestras biológicas (12,7%) y superficies (8,5%). Lo cual evidencia que es la primera causa de brotes de origen alimentario en el territorio nacional. Los alimentos involucrados en estos brotes son: el queso, el pollo en sus diversas preparaciones, el arroz y sus diferentes mezclas con otros alimentos y la carne preparada (Fuentes, y Moreno. 2011).

Es importante recalcar que la aparición de ***Staphylococcus*** spp, a menudo es indicio de contaminación a partir de piel 17,2 % y de mucosas de personas y animales; está presente en fosas nasales, garganta, cabello en un 34,4% (Padilla. 2007; Fuentes y Moreno. 2011); las tasas de portadores se aumentan cuando hay casos de sinusitis, faringitis y procesos gripales (Jukes, *et al.* 2010).

3.2.3. Parámetros Frigocolanta®.

Para Frigocolanta® es indispensable la verificación y confirmación de ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positiva en alimentos carnicos, debido a la importancia de esta bacteria en la inocuidad de los mismos.

Para la identificación de ***S. aureus*** coagulasa positiva es necesario utilizar algunas pruebas bioquímicas y medios de cultivo especiales que permitan su fácil determinación. Esta identificación se basa en las enzimas y toxinas que produce este microorganismo.

Aprovechando estas características se han diseñado medios para aislar esta bacteria, como son Baird-Parker (medio utilizado en Frigocolanta). Es un medio excelente para el recuento de

Staphylococcus aureus, incluso, aunque se trate de células que sufrieron un daño subletal. Además, es el medio selectivo más corrientemente usado. Su composición consta de piruvato sódico el cual ayuda a recuperar las bacterias lesionadas; su poder selectivo se debe a la presencia de telurito, cloruro de litio y glicina. En el medio la característica positiva de la presencia de ***Staphylococcus aureus*** es la presencia de un aspecto negro, debido a la reducción del telurito, con un halo transparente que revela la actividad lipolítica sobre la yema de huevo; sin embargo, las colonias deben confirmarse mediante un examen con plasma de conejo, para observar la actividad de la enzima coagulasa (Merck™, 12th Edición).

Asumiendo parámetros nacionales e internacionales, Frigocolanta ha desarrollado prácticas confiables y procedimientos convencionales para el análisis de ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positiva, mediante el recuento en placa con Agar Baird Parker (Merck); este análisis se le realiza de forma rutinaria en la planta y mantiene parámetros internos como son los expuestos en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros internos microbiológicos de Frigocolanta.

	Análisis	Parámetro (ufc/ml o G)
Carne fresca	Coliformes totales	<2500
	Coliformes fecales	<1100
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<100
	E.C.S.R	<100
	<i>Salmonella sp</i>	Ausencia

Autor: Colanta, 2016.

3.2.4. Requisitos para aplicar métodos alternativos.

Los métodos alternativos son ampliamente utilizados tanto por laboratorios de autocontrol como en laboratorios oficiales de alimentos.

Hay aspectos importantes para garantizar una adecuación de métodos como son:

- ✓ Plazo de obtención de resultados
- ✓ Matrices objeto de análisis
- ✓ Inversión en equipamiento
- ✓ Cualificación del personal
- ✓ Infraestructura del laboratorio
- ✓ Validación o reconocimientos por organismos nacionales o internacionales.

Es así que; un aspecto a tener en cuenta es la citada en la Norma ISO 17025:2005. En el punto 5.4.5.2 la cual, dictamina que se debe validar los métodos no normalizados, los métodos diseñados /desarrollados internamente, los métodos normalizados utilizados fuera de su campo de aplicación previsto y las aplicaciones y modificaciones de los métodos referentes.

A sí mismo; se deben tener esquemas internacionales reconocidos, por ejemplo la Norma ISO 16140, cual centra su información en protocolos para la validación de métodos alternativos, como es el caso de los Petrifilm. Así se lograra una validación completa.

En cuanto a las placas Petrifilm Staph Express (3M); ha sido aprobado su uso por:

Aprobaciones técnicas internacionales:

- ✓ AOAC: Association of Official Analytical Chemist (Método Oficial de Análisis)
- ✓ AFNOR
- ✓ Health Protection Branch
- ✓ Otras

Aprobaciones Nacionales

- ✓ INVIMA

Entre las más importante aprobación aparece el método; AOAC Método Oficial 2003.11 para el recuento de *Staphylococcus aureus* en cárnicos, mariscos y aves.

La evaluación del desempeño para métodos a prueba, según Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (Cofepris) Mexicana se basa en lo descrito en la tabla 4.

Tabla 4. Protocolo para la evaluación de desempeño de método alternativo

Etapa	Descripción
1. Elaboración del protocolo	Elabora el protocolo, cumpliendo con los requerimientos mínimos para la evaluación.
2. Selección de las matrices	Las selección de la muestra se basa en criterios definidos por el plan a evaluar, en esto es preferible las muestras no contaminadas. Se asegura con contar con la cantidad de muestras necesarias y la presencia o ausencia del microorganismo de interés.
3. Preparación del inculo	Realizar los cálculos para determinar el tamaño del inculo. Durante la evaluación del desempeño se verificar el inculo empleado y lo identifica como valor de referencia.
4. Preparación de la muestra	Homogenizar la muestra perfectamente. En condiciones asépticas procesa según el método que tenga el laboratorio para su análisis. Y la fortificación de la muestra debe realizarse conforme se describe cada método a usar. Ver ítem 4 metodologías.
5. Ejecución del protocolo	Seguir el método a prueba, analizando la muestra, el número de veces que corresponda; según criterios de aceptación.
6. Cálculos	<p>Método cuantitativo</p> <p>-Repetitividad.</p> <p>Calcular las unidades formadoras de colonia o calcular el log.</p> <p>Se calcula la desviación estándar, promedio, DSR y su valor r.</p> <p>-Reproducibilidad</p> <p>Utilizando el método de referencia, se aplica la siguiente formula; se</p>

necesita dos analistas en el mismo ensayo a diferentes momentos.

$$R = 2,8 * \sqrt{\frac{DSR_1^2 + DSR_2^2}{n}}$$

-Recuperación.

Con los datos obtenidos en repetitividad se calcula la cantidad de UFC, en cada repetición y calcula el logaritmo de cada cuenta, promediando los log, se calcula el log del inóculo verificado.

% Recuperación

$$= \frac{\text{media del log de las contadas} \times 100}{\text{log de las UFC inoculadas}}$$

-Sesgo.

A partir de los cálculos de recuperación, calcular la diferencia de las medias de los log menos el log de inóculo utilizado

$$\text{Sesgo} = [Ve - Vo]$$

Ve: valor esperado

Vo: valor obtenido.

7. Definición de Incertidumbre

Para métodos cualitativos se mencionan las diferentes fuentes de incertidumbre como por ejemplo:

Distribución del inóculo; personal operativo; mediciones, diluciones, homogenización, calidad de los medios, temperatura de la inoculación.

Y para métodos cuantitativos además de los ya mencionados también se mencionan; la naturaleza del método a evaluar; cabe anotar que en los métodos cuantitativos, el Sesgo no contribuyen a la incertidumbre del método, dado que los resultados dependen de las condiciones definidas en el método. Tales como la temperatura, tiempo de incubación, medio de cultivo, etc.

8. Elaboración de

Se basa en la construcción del informe; para la evaluación del

informe.

desempeño donde se hace relevante:

Título, objetivos, campo de aplicación, equipos, materiales; Reactivos y medios de cultivo, muestras o matrices, métodos de ensayo, desarrollo experimental, análisis de resultados, conclusiones, bibliografía y anexos.

Nota: el informe debe incluir firmas de quien elaboro, reviso y aprobó.

Tomado y modificado de: (ISO 16140,2003; Cofepris, 2012).

Y por otro lado; el método alternativo son las placas Petrifilm Staph Express (STX) (3M); las placas para el recuento de ***Staphylococcus aureus*** son un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene un agente gelificante soluble en agua fría. El medio modificado cromogénico Baird-Parker en la placa es selectivo y diferencial para el ***Staphylococcus aureus***. Las colonias rojo/violeta en la placa son ***S. aureus***. Cuando solamente se aprecien colonias rojo-violeta, cuente las colonias y la prueba se habrá completado.

Si encuentra flora de acompañamiento, el disco Staph Express Petrifilm™ de 3M™ se debe utilizar para diferenciar el ***S. aureus*** del resto de las colonias sospechosas. El disco Staph Express Petrifilm se debe utilizar cuando la placa presente colonias que no sean color rojo/violeta; por ejemplo, colonias negras o azul-verdosas. El disco Staph Express Petrifilm contiene un indicador y ácido desoxirribonucleico (DNA). El ***S. aureus*** produce desoxirribonucleasa (DNasa) y la DNasa reacciona con el indicador para formar zonas rosadas. Cuando el disco se inserta en la placa, el ***S. aureus*** (y ocasionalmente el *Staphylococcus hyicus* y el *Staphylococcus intermedius*) produce una zona rosada. Otros tipos de bacteria no producen zonas rosadas. El *S. aureus*, el *S. hyicus* y el *S. intermedius* integran la mayoría del grupo de los organismos comúnmente conocidos como *Staphylococcus coagulasa positiva* (3M, 2007).

4. METODOLOGÍA.

4.1. Muestreo.

En la **Fase I**; las muestras fueron seleccionadas aleatoriamente, el estudio se realizó con 77 muestras; de las cuales las matrices carne frescas (CF) fueron: 41; Productos cárnicos comestibles (SP): 21; vencimientos (V): 7 y matrices de la competencia (COMP): 8. Para la carne frescas (CF) se utilizaron los cortes programados para los días miércoles y jueves (que eran los correspondientes a la rotación que se hace).

Para la **Fase II**; las matrices fueron seleccionadas según sus características únicas. Se seleccionaron 13 muestras: 1 CR (carne de res), 1 CC (carne de cerdo), 1 CT (carne de ternera), SP (subproductos) [MON (mondongo), CHCH (chinchurria), BCH (buche), LT (lengua de ternera), BAZR (bazo de res), CABR (cabeza de res), ASC (asadura de cerdo), CABC (cabeza de cerdo), MAD (madejas), ORC (orejas de cerdo)]; y a éstas se les realizó la contaminación artificial (González. *Et al.* 2010); (Colanta, 2016).

4.2. Preparación de inóculos.

En la **Fase I**; se generó la dilución 10^{-1} ufc/gr o mL de las matrices ensayadas.

Para la **Fase II**; la preparación del inóculo se utilizó un cultivo de ***Staphylococcus aureus*** ATCC 25923, los cultivos se encuentran liofilizados en tubos Eppendorf a 4 °C. Se tomó una perla del microorganismo y se adiciono a 10 ml de caldo BHI (Merck), luego se incubó a $37 \pm 1^\circ$ C por 24 horas. El proceso anterior se realizó en una cámara de flujo laminar (Pc4Pascal) por razones de bioseguridad e inocuidad.

Para la preparación del inóculo se tomó con la pipeta aproximadamente 600 μ L de ***Staphylococcus aureus*** y se adiciono a un tubo con 10 mL de solución salina al 0.9 % hasta alcanzar la turbidez del tubo referente MacFarlán 0,5. Luego el cultivo de ***Staphylococcus aureus*** fue diluido en agua peptonada estéril al 0.1% con pH 7.2; para obtener los niveles de inóculo con los que se inocularon las muestras: 10^1 (concentración baja; 1-10 UFC/ml) y 10^2 (concentración media; 10-100 UFC/ml) (Cuellar. 2015); (Colanta, 2016).

4.3. FASE I. “ALIMENTOS NATURALMENTE CONTAMINADOS”

4.3.1. Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva por método tradicional (agar Baird Parker).

Se pesaron 10 g de todas las muestras en bolsas genéricas previamente liberadas por “Control Calidad”; para evitar interferencias de microorganismos por contaminaciones cruzadas; a esta se le adiciono 90 ml de agua peptonada estéril al 0.1% con pH 7.2. Para la dilución 1/10 (10^{-1}) se siguió con la homogenización por 15 segundos en el Stomacher a velocidad media. Se tomó 0,1 ml de la dilución 10^{-1} se inóculo en superficie y extendió por todo el agar usando asa de Drigaski estéril. Se esperó que el inóculo se absorbiera en promedio entre 5 a 10 min. La incubación fue a $37 \pm 1^\circ \text{C}$. durante 48 h.

Después del tiempo de incubación, se realizó el conteo de las colonias características de este microorganismo en el agar Baird Parker (BP). Éstas se presentan como: colonias negras, circulares, brillantes, convexas, lisas con diámetro de 1 a 2 mm, con zona circular opaca y un halo claro alrededor de la colonia (Jukes. *Et al*, 2010; Colanta, 2016).

4.3.2. Prueba de la presencia de la enzima coagulasa.

Con una pipeta estéril de 1 mL se tomaron 0.3 mL de la suspensión del microorganismo crecido previamente en el caldo infusión cerebro corazón (BHI, Merck), a la cual se le adiciono 0.3 mL de plasma de conejo. Dicho plasma previamente diluido volumen a volumen con solución salina estéril.

Se incubo a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ y observo durante 6 h. en intervalos de 1 hora.

4.3.3. Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva por Petrifilm™ Staph Express (3M™).

En bolsa genérica estéril, se pesaron 10 gr de todas las muestras, a las cuales se les adiciono 90 mL de agua de peptona tamponada al 0.1%; para la dilución 1/10 (10^{-1}); se homogenizo en Stomacher por 15 segundos. Se tomó 1 ml de la dilución, y se aplicó sobre el Petrifilm Staph Express. Se dejó caer la lámina superior suavemente. Se esperó 1 minuto para permitir que solidifique el gel.

Se procedió a incubar a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 ± 2 horas. Se contaron las colonias rojo-violetas. Las azul-verdosas no son *Staphylococcus* spp. Y las colonias negras se requieren la utilización del Disco Staph Express (3M). (SENASA, 2010); (3M, 2007).

4.3.4. Disco Staph Express Petrifilm

La utilización del disco se debió a la presencia de colonias negras no diferenciadas.

Se levantó la película superior de la placa Petrifilm y se colocó el disco de DNAsa en la cavidad de la placa. Después se bajó la película. Se presionó suavemente el disco sobre toda el área del Petrifilm, con el fin de garantizar un contacto uniforme del disco con el gel y eliminar cualquier burbuja de aire. Se incubaron las placas con los discos cara arriba, por 1-4 horas a $37 \pm 1^\circ \text{C}$; y se contaron las colonias con zonas rosadas.

4.4. FASE II “CONTAMINACIÓN ARTIFICIAL”

4.4.1. Controles

Se llevaron controles a el agua peptonada, a las matrices (V) sin inculo, a la concentración de 10^8 (Macfarlán N° 0.5), 10^2 (concentración media) y 10^1 (concentración baja).

4.4.2. Contaminación de las muestras

Se pesaron 10 gramos de las muestras en una bolsa estéril esto por duplicado, luego se agregaron 89 ml de agua peptonada estéril al 0.1% con pH 7.2, y se inocularon 1 ml de las diluciones 10^3 y 10^2 ; se procedió a homogenizar por 15 segundos. Una vez listas las muestras inoculadas con cada uno de los niveles de inóculo, se procedió a sembrar en Petrifilm™ Staph Express (STX) y agar Baird Parker (B.P). Siguiendo el método AOAC 2003.08. Y lo mismo para el método tradicional con 0,1 ml del inóculo en agar Baird Parker por el método AOAC 975.55. Todo por duplicado.

4.5. Modelo estadístico

El modelamiento estadístico consto del uso del programa Excel 2010. En el cual los recuentos obtenidos en los diferentes ensayos se convirtieron a $\log_{(10)}$.

4.5.1. Métodos cualitativos:

Desde los datos en forma logarítmica (\log_{10}), se les aplico un análisis de regresión, y con sus diferencias logarítmicas se les realizo la prueba McNemar (Fornes, 2008). Siguiendo el lineamiento a continuación descrito.

Tabla 5. Prueba McNemar.

Respuesta		Método referente	
		positivo (R+)	negativo (R-)
Método a validar	positivo (A+)	+/+ concordancia positiva (PA)	-/+ desviación positiva (PD)
	negativo (A-)	+/- desviación negativa (ND)	-/- concordancia negativa (NA)

Eficacia relativa (AC): El grado de concordancia entre la métodos ensayados y se realizan según la ecuación 1.

$$AC = \frac{(PA + NA)}{(NA + PA + PD + ND)} \times 100$$

Ecuación 1. Eficacia relativa (AC).

Sensibilidad relativa (SE): Es la capacidad del método alternativo al detectar el microorganismo en estudio y se utilizó la ecuación 2.

$$SE = \frac{PA}{PA + ND} \times 100$$

Ecuación 2. Sensibilidad relativa (SE)

Especificidad relativa (SP): Es la capacidad del método alternativo para no detectar el microorganismo cuando no es detectado por el método de referencia, en la cual utilizo la ecuación 3.

$$SP = \frac{NA}{(NA + PD)} \times 100$$

Ecuación 3. Especificidad relativa (SP).

4.5.2. Método estadístico descriptivo.

Con los datos logarítmicos de la "Contaminación Artificial". Se aplicó la opción de "estadística descriptiva" de Excel 2010.

6. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Los análisis microbiológicos en Frigocolanta constituyen una herramienta básica para el control de productos cárnicos, ya que permite establecer el grado de contaminación biológica de estos. Y es así que la necesidad de implementar nuevos métodos más eficaces, precisos y rápidos se hacen indispensables para continuar asegurando que los alimentos sean inocuos para los consumidores.

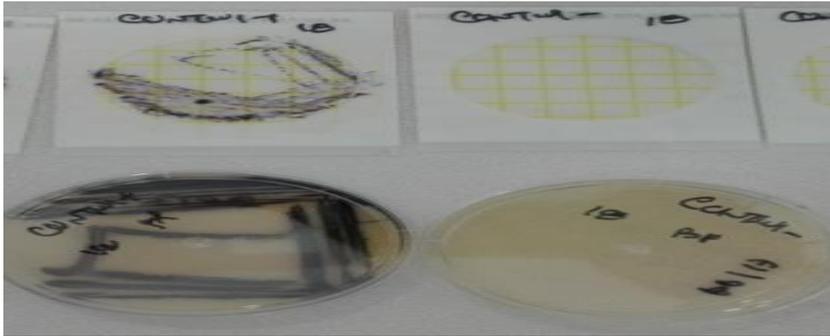
Ahora bien, las placas de Petrifilm Stamp Express (3M), es un buen método para el cambio del método referente (Baird Parker), dadas sus ventajas en cuanto a la enumeración y selectividad de ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positiva. Según los datos adscritos. Este método es poseedor por parte de la AOAC la validación para su uso. Dado que la AOAC es una validación multi-laboratorios, lo cual proporciona un alto grado de confianza en el desempeño de este método, proporcionando resultados creíbles, defendibles y reproducibles.

Entre otras de las ventajas es la ganancia del tiempo ya que es un medio listo para su uso, genera mayor espacio en la incubadora, obtención de resultados más rápidos (24 ± 2 horas), es reconocida por varias organizaciones internacionales como son: AOAC, AFNOR · Health Protection Branch entre otros.

6.1. FASE I. “ALIMENTOS NATURALMENTE CONTAMINADOS”

Se llevó el control positivo con ***S. aureus***. (ATCC 25923) y el control negativos sin inóculo; con el fin de asegurar la calidad de los medios de cultivos preparados, utilizados en los análisis microbiológicos del ensayo (imagen 1).

Imagen 1. Control positivo y negativo.



Fuente: Autor.

El análisis de regresión lineal dio resultados expresados en la tabla 6, se obtuvo una correlación (R^2) de 0,99 siendo estos datos representativos para la linealidad de los resultados (ISO 16140, 2003). En 77 muestras analizadas en la primera fase del ensayo.

Tabla 6. Estadística de regresión lineal.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99664027
Coefficiente de determinación R^2	0,99329184
R^2 ajustado	0,98013394
Error típico	0,11362763
Observaciones	77

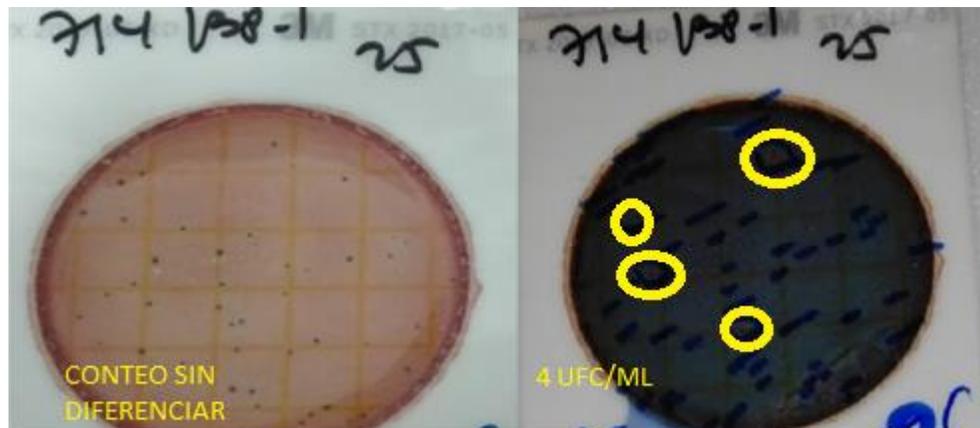
En evidencia unas diferencias significativas en algunas matrices como se muestran en la tabla 7. Por ejemplo; la muestra 495 tiene una diferencia significativa positiva para el Petrifilm, en el cual evidencia una mayor recuperación del microorganismo que el método referente. Siguiendo la misma matriz tiene una diferencia significativa entre métodos de 0,48 (media Log); en palabras castizas su recuperación fue mayor de 4-5 Ufc que lo expresado por el recuento en ufc del método referente (agar Baird Parker).

Tabla 7. Diferencias logaritmos entre recuentos de los métodos.

N° Lab.	Muestra	Lote	RTO. S.AUREUS Baird Parker ufc/g o ml		RTO. S.AUREUS PETRIFILM ufc/g o ml		Diferencia log
			Promedio	Log	Promedio	Log	
495	OREJAS DE CERDO	0172200536	10,0	1,0	30,0	1,48	0,48
714	SANGRE BOVINA	NA	10,0	1,0	40,0	1,60	0,60
V.494	PULMÓN CERDO	0032200028	10,0	1,0	25,0	1,40	0,40

Así mismo en la matriz 714 se observa mayor recuperación en el Petrifilm Staph Express que en el agar Baird Parker, pero esta matriz tiene la peculiaridad que por ser de color rojo no se logró un fácil conteo de Ufc; por ende surge una desventaja para su enumeración dadas las características del Petrifilm para su identificación y enumeración. A la cual se superó como se observa en la imagen 2. Con el disco de DNAsa, evidenciando 4 UFC de *S. aureus* coagulasa positiva.

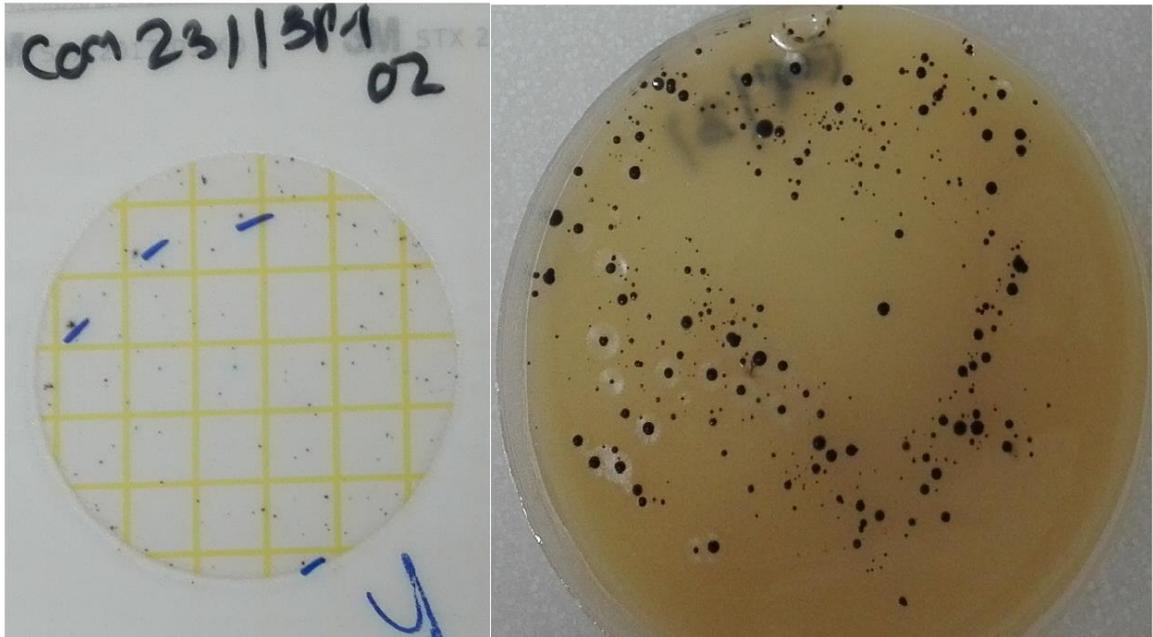
Imagen 2. Sangre bovina.



Fuente: Autor.

Ahora bien; en cuanto a las matrices sembradas de las competencias (COMP) la falta de diluciones no se pudo verificar mejor la recuperación del microorganismo en estudio, ver imagen 3. En la cual se evidencia un pool de microorganismos indiferenciados o de morfologías atípicas a lo cual se les dio un C.E. > 150 UFC/gr para el Petrifilm Stamp Express y > 200 UFC/gr en el Agar Baird Parker.

Imagen 3. Evidencia grafica de análisis a matrices de la competencia.



Fuente: Autor.

En referencia citada: Santos, 2008; la autora concluye que los resultados obtenidos del Petrifilm Stamp Express (STX), al inocular *S. aureus*, *S. hyicus* y *S. intermedius*. Permitted el crecimiento de estos microorganismos; y en la placa con agar Baird Parker (B.P). No permitió el crecimiento atípico de *S. aureus* coagulasa positiva. Observado también en esta evaluación. En cuanto a la siembra de las matrices de la competencia (COMP). Adicionalmente las cepas interferentes crecieron también con color rojo-violeta en el Petrifilm Stamp Express (STX), por ende indica la autora que es necesaria la realización de otras pruebas para la identificación de *S. aureus* coagulasa positiva. Aunque estos microorganismos también pertenecen al grupo de microorganismo coagulasa positiva (3M. 2007). Al igual, la autora verifico que existen diferencias significativas entre los métodos cuanto la cantidad inoculada es alta, esto en matrices de leche esterilizada.

Ahora bien en cuanto a la realización de la prueba de McNemar la comparación de los métodos dio como resultado de las 77 matrices ensayadas 63 matrices no presentaron diferencias significativas (PA); 7 (PD) de estas fueron positivas para el Petrifilm Stamp Express (STX) y 7 de estas matrices dieron resultados negativos (ND) para Petrifilm Stamp Express. Al igual estas últimas son

las matrices sembradas de las competencias (COMP). Las cuales no se tuvieron en cuenta para esta descripción Ver Tabla 8.

Tabla 8.Comparación de los métodos.

RTO. <i>Staphylococcus aureus</i> en Baird Parker.			
		Positivo por el método de referencia (R+)	Negativos por el método de referencia (R-)
RTO. <i>Staphylococcus aureus</i> Petrifilm™	Positivo por el método alternativo (A+)	63 PA	7 PD
	Negativos por el método alternativo (A-)	0 ND	0 NA
Total		63 N+	7 N-

A estos resultados cualitativos se les aplicó las ecuaciones 1, 2 y 3; en el cual los resultados comparados del método alternativo versus al de referencia dieron los siguientes resultados:

Exactitud relativa: **AC** 90 %

Especificidad relativa: **SE** 90 %

Sensibilidad relativa: **SP** 0 %

Como ya se mencionó anteriormente la exactitud relativa (AC), da una concordancia y veracidad entre los datos por los dos métodos analizados. Teniendo un 90 % de exactitud entre los métodos evaluados; evidenciando que no hay diferencia significativa entre el método alternativo (Petrifilm) y el usado como referencia (Baird Parker) en Frigocolanta.

A su vez se dio una especificidad relativa (SE) del 90 % a lo cual este método alternativo tiene una alta habilidad para detectar el microorganismo referente. Además; su especificidad relativa (SP) fue de 0 % en teoría, pero se ha observado la sensibilidad que tiene el método en la detección del microorganismos referente (**S. aureus** coagulasa positiva) y la posibilidad de su enumeración, por el contrario el método tradicional se observa un bajo nivel de recuperación del microorganismo (Gonzalez. *Et al* 2010).

Resultados similares documentados por: Nogueira. *Et al*, 2009; hablan que en cuanto al ensayo realizado por el autor, no se encontraron diferencia significativa entre el agar Baird Parker (B.P) y el Petrifilm Stamp Express (STX); en cuanto a la enumeración e identificación de **S. aureus** coagulasa positivo en leche cruda y queso fresco.

Y Teramura. *Et al* 2010; en comparación del método CD-XSA frente al agar MSEY y agar Baird Parker (B.P). Referencio una correlación de 0,945 y CD-XSA frente a las placas de Petrifilm STX, mostraron una correlación de 0.977. Teniendo una mayor correlación entre datos y satisfaciendo la necesidad del autor en cuanto a la utilidad de la evaluación del método alternativo.

Otro punto a favor es que según el protocolo de medición establecido en el estándar ISO 16140. Se le da prioridad al análisis de muestras naturalmente contaminadas. Si por el contrario no dan datos significativos estos serán remplazados por las contaminaciones artificiales (ISO 16140, 2003). En este documento se evaluó este tipo de metodología pero la baja prevalencia del microorganismo en matrices cárnicas de Frigocolanta®, hace necesaria la contaminación artificial. Ya que se genera incertidumbre entre los datos obtenidos.

Donde se considera el caso hipotético que las matrices cárnicas pudieron presentar falsos positivos ya que en el uso de la prueba de McNemar; Se evidencia mayor recuperación por el sistema alternativo, observación que también fue documentada por Jacó de souza. *Et al*, 2015. A lo cual surge la pregunta: ¿la cantidad del inculo al momento de la siembra conlleva a que el Petrifilm STX tenga una mayor recuperación de dicho microorganismo?

6.2. FASE II “CONTAMINACIÓN ARTIFICIAL”

Esta etapa de la evaluación tenía como fin evaluar el desempeño de los sistemas con una cantidad conocida de inóculo, al seguir el protocolo de Colanta para la contaminación artificial, se evidenciaron aspectos definitivos que no lograron el objetivo cuantitativo de este.

Aspectos como el uso de patrón Macfarlán 0,5 ($1.5 \cdot 10^8$ ufc/ml); el paso de microorganismos crecidos en BHI para la formación del ya mencionado patrón no se logró una estandarización del inóculo inicial. Además de variables entre matrices utilizadas no se logró el fin de esta etapa de la evaluación.

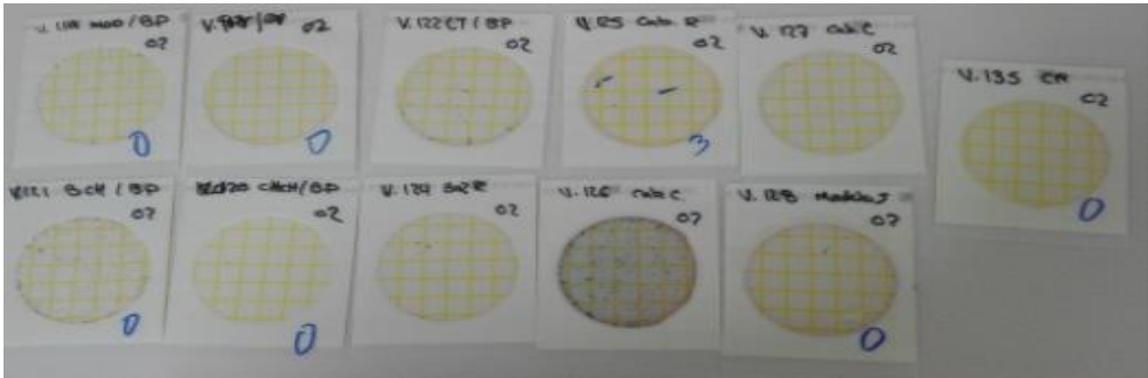
Para rescatar en esta fase se realizó una comparación cualitativa desde una matriz por los dos sistemas utilizados.

En este ensayo se llevaron controles como fueron:

- Control positivo: con ***S. aureus*** (ATCC 25923) y el control negativos sin inóculo.
- Esterilidad del agua peptona de 9 ml y 90 ml utilizados como diluyentes en las placas Petrifilm Aerobios 3M®.
- Un tercer control fue verificar la cantidad de microorganismos en las matrices a evaluar imagen 4.

Ahora bien antes del inóculo se procedió a sembrar en placas de Petrifilm Stamp Express (STX) con muestras sin contaminación, con el fin de verificar la cantidad de ***Staphylococcus aureus*** en las matrices a evaluar. Como se esperaba solo en la matriz 125 se contaron 3 Ufc/gr de ***S. aureus*** coagulasa positiva y en la muestra 126 el cual el crecimiento fue elevado pero sin colonias típicas de ***S. aureus*** coagulasa positiva. Las demás matrices mostraron ser inocuas.

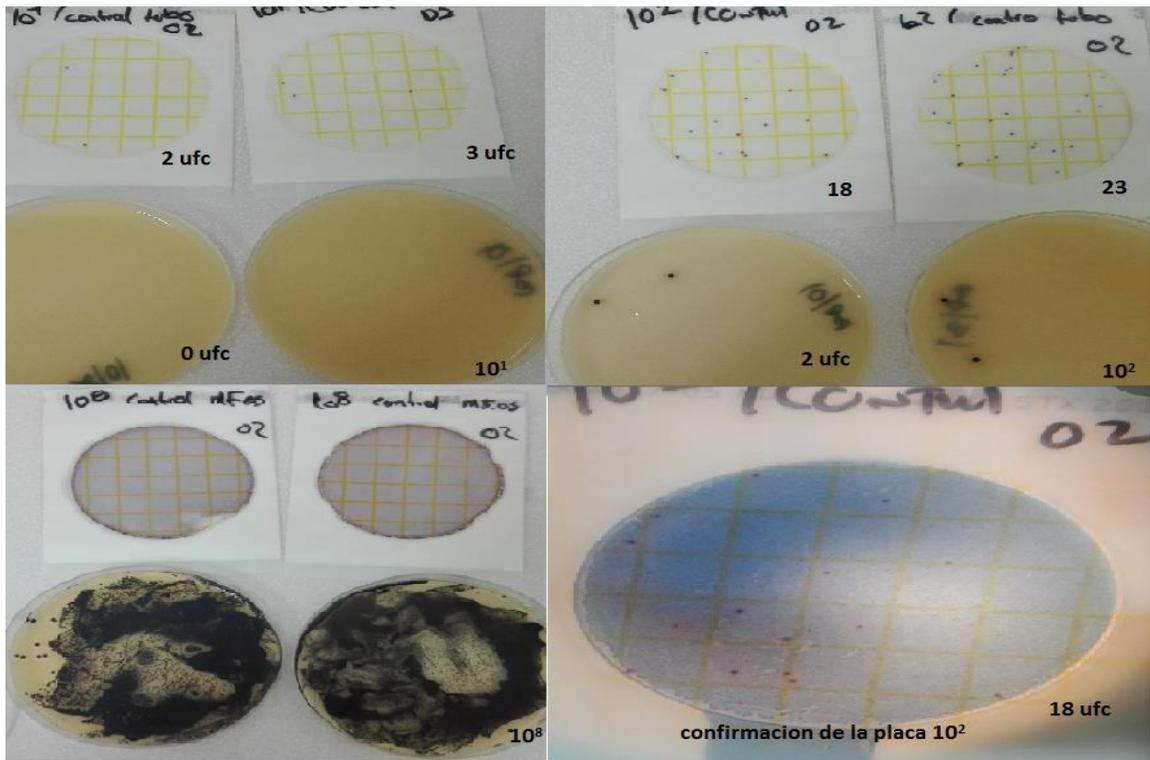
Imagen 4. Verificación de las matrices a contaminar.



Fuente: Autor.

- Y por último la verificación de la cantidad de microorganismo a inocular en las matrices a ensayar, imagen 5.

Imagen 5. Control de los inóculos 10^8 , 10^2 y 10^1 ufc/ml.



Fuente: Autor.

En la imagen 5 se observan los controles llevados a cabo antes de la contaminación esto con el fin de saber el aproximado de la carga microbiana inoculada en las matrices; como se puede observar para la dilución 10^1 la cantidad del inóculo que se esperaba era de 1-10 ufc, en la cual los Petrifilm Stamp Express (STX) si entraron en este rango pero el agar Baird Parker no obtuvo crecimiento; en la dilución 10^2 el inóculo para el Petrifilm Stamp Express (STX) también entro en el rango de 10-100 ufc pero se evidencia de todas formas un bajo nivel de microorganismos.

Por otra parte, en la dilución 10^8 el inóculo no se puede contar pero se evidencia alto crecimiento sobre toda la placa tanto en el Petrifilm Stamp Express (STX) como en el agar Baird Parker; para la confirmación control de **S. aureus** coagulasa positivo, con disco Stamp Express (disco de ADNasa) se observa una conteo igual al realizado antes de su uso.

Ahora bien los resultados obtenidos después de la contaminación artificial fueron los expresados en la tabla 10 (contaminación media) y la tabla 11 (contaminación baja) (ANEXO 1).

De los cuales se desprendió el análisis descriptivo expresado en la tabla 9.

Tabla 9. Análisis descriptivo

	Nivel de contaminación baja		Nivel de contaminación media	
	<i>Baird Parker</i>	Petrifilm STX	<i>Baird Parker</i>	Petrifilm STX
Media	0,27115231	0,57282633	0,65081112	0,8350143
Error típico	0,14993015	0,13478765	0,15204911	0,13081427
Desviación estándar	0,54058086	0,48598378	0,54822086	0,47165755
Varianza de la muestra	0,29222767	0,23618023	0,30054611	0,22246084
Rango	1,462398	1,5797836	1,57403127	1,41912931
Mínimo	-0,30103	-0,30103	0	0,30103
Máximo	1,161368	1,2787536	1,57403127	1,7201593
Cuenta	13	13	13	13

Como se puede evidenciar para la concentración media (anexo 1). Las matrices CT, BCH, LT, ASAC Y ORC, están en el rango de 10-100 ufc, pero el inóculo generado es muy bajo, ya que se

partió de un patrón Macfarlán 0,5 ($1.5 \cdot 10^8$ ufc); y en la última dilución se adiciono 1 ml en 89 ml de APE más los 10 gr de la matriz. Pero al igual en el control del inoculo no supero las 50 ufc sembrando directamente.

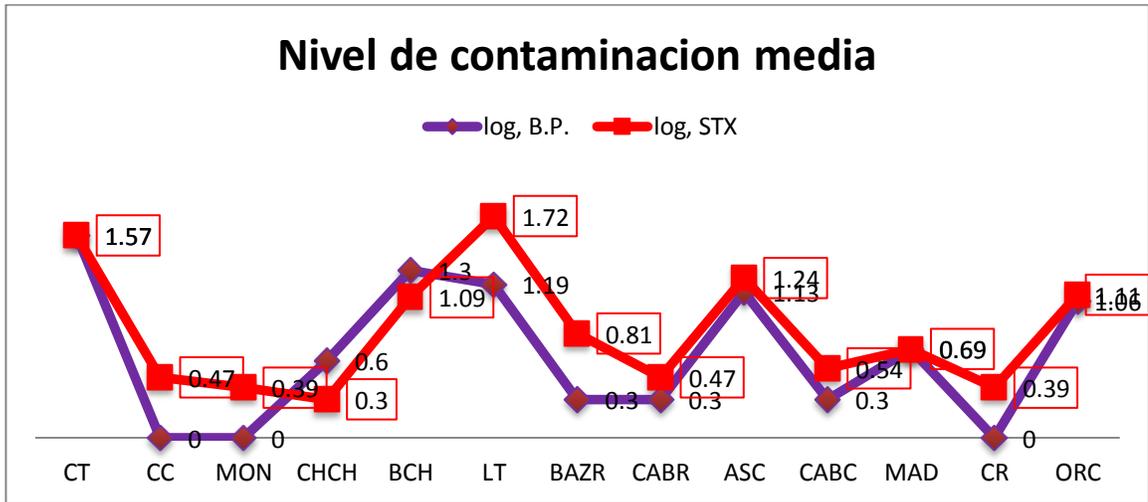
Al igual que el anterior nivel de contaminación en el nivel de concentración baja se evidencia una baja presencia del **S. aureus** coagulasa positiva. Excepto en la matriz de ASC (asadura de cerdo); en la cual se observa un crecimiento más elevado que el rango pero esto se puede deber a la matriz contaminada antes de la inoculación.

Por ende la evaluación se basa en el análisis descriptivo entre los sistemas Petrifilm Staph Express (STX) y el método oficial (Baird Parker) de Frigocolanta para la identificación y enumeración de **Staphylococcus aureus** coagulasa positiva en alimentos cármicos.

Pero para fines de la evaluación se logró la comparación de los sistemas por medio de la estadística descriptiva; como se observa en la tabla 9; Donde el nivel de contaminación media, teóricamente tendría que está en rango de 10-100 ufc, lo cual no se cumple; pero las diferencias estadísticas asumen que los métodos analizados en cuanto a su comportamiento de crecimiento no esta tan errado; por ejemplo el agar Baird Parker presenta en esta contaminación una media de 0,27 y para el Petrifilm Stamp Express (STX) un valor de 0,57 con una diferencia de 0,3 puntos. Resultados también observados en los alimentos naturalmente contaminados con una recuperación de microorganismos mayor para el Petrifilm Stamp Express (STX). Otro valor relevante es su desviación estándar que para Baird Parker fue de 0,54 y Petrifilm Stamp Express (STX) fue de 0,48; que se relación con concordancia de los datos referentes y los datos del método alternativo. O dicho de otra manera la variación que se espera con la media aritmética (Gonzalez. *Et al* 2007). En este caso esto se tomó como la igualdad que genera entre sus variaciones (Ufc/gr) a lo cual puede ser visto como una forma de incertidumbre (Sanchez. *Et al*, 2011).

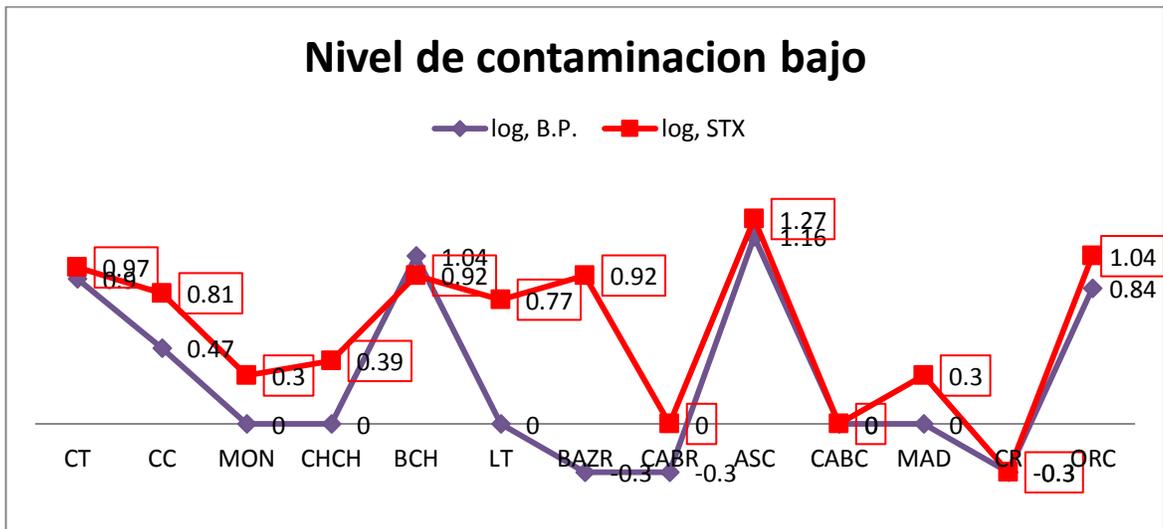
Ahora bien el nivel de contaminación media (imagen 6) se observan que de las 13 matrices evaluadas, 11 matrices analizadas con el Petrifilm Stamp Express (STX) estas en un nivel de contaminación igual o superior que el referente con Baird Parker, sin ser tan lejano los valores obtenidos por debajo del valor de referencia para los Petrifilm Stamp Express (STX) entre los sistemas.

Imagen 6. Gráfica del nivel de contaminación media.



Al igual que la contaminación media en la contaminación baja se presentó un comportamiento similar excepto en el análisis de bazo de res (BAZR) el cual solo obtuvo 1 ufc en Baird Parker y 8-9 ufc en el Petrifilm Stamp Express (STX); si se observa las verificaciones (imagen 4) este no presentó crecimiento lo cual se asume como una mala práctica en cuanto a la homogenización de la matriz; por otro lado en la matriz de orejas de cerdo se presentó en el nivel bajo un crecimiento similar al del expuesto en el nivel medio, pero si se compara con la verificación esta matriz presentó crecimiento pero no se logró una identificación de *S. aureus* coagulasa positiva, la cual no se pudo hacer la corrección de datos.

Imagen 7. Gráfica del nivel de contaminación baja.



Concluyendo, los datos recopilados describen que los métodos según sea la carga microbiana de las matrices tienden a generar resultados similares, en los dos ensayos se demostró mayor poder de recuperación por el Petrifilm Stamp Express STX, pero también se demostró la baja selectividad que posee este Petrifilm Stamp Express STX, para la identificación exclusiva de ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positiva.

En referencia con otros autores se llega a las mismas conclusiones por ejemplo; Mccarron. *Et al*, 2009; Demostró que el uso del Petrifilm Stamp Express STX para la identificación de ***S. aureus*** en leche con mastitis, estimó una sensibilidad y especificidad de 92,6 y 89,5 % respectivamente, considerando la prueba muy buena para su uso.

Cuellar. 2015; demostró en matrices vegetales, leche semidescremada, y salchichas; que el sistema Petrifilm Stamp Express (STX), cumplió en un 100% con los criterios de reproducibilidad y repetibilidad, con valor r promedio de 0.223 log₁₀ Ufc/gr o mL y una desviación estándar relativa (RSDr) <10% en todas las muestras.

Jacó de souza. *Et al*, 2015; concluyeron que cuando se compara agar Baird Parker y Petrifilm Stamp Express STX para el recuento de ***S. aureus*** en alimentos contaminados de forma natural o artificialmente, no se demuestra una diferencia significativa entre los sistemas, esto en matrices como la leche cruda.

7. CONCLUSIONES.

- Al evaluar el desempeño del Petrifilm Stamp Express, se concluye que no hay una diferencia significativa entre el métodos referente y el sistema Petrifilm Stamp Express (STX) para el análisis microbiológicos de ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positiva en matrices cárnicas ya que su correlación lineal dio como resultado un r de 0.99 de confiabilidad entre datos por alimentos contaminados naturalmente.
- Las matrices contaminadas naturalmente procedentes de la producción diaria de Frigocolanta, se observó que ninguna de estas matrices superó los 100 UFC/gr (tabla 4); parámetro interno de Colanta. Con lo cual se puede deducir que este es un sistema adecuado para ser aplicado en el análisis microbiológico de la enumeración e identificación de ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positiva para Frigocolanta®.
- En cuanto a comparar los métodos con matrices de la competencia no se logró el objetivo, ya que errores procedimentales y desconocimiento de la carga microbiana en dichas matrices, dieron conteos elevados no logrando así una identificación y enumeración de ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positiva.
- La utilidad de la metodología “Contaminación artificial”, buscaba la evaluación del desempeño del método ensayado comparado con el método de referencia; en un rango de crecimiento microbiano conocido; este fundamento no se logró, evidentemente por que la carga microbiana inicial no fue la correcta, pero se compararon aspectos cualitativos entre los dos métodos demostrando así la cercanía entre valores logarítmicos de cada una de las matrices ensayadas.
- Se evidencia que el sistema Petrifilm Stamp Expres (STX) presenta ventajas sobre el sistema de referencia en cuanto a que son más prácticos, generan resultados validos a 24 horas y su confirmación de la presencia de la enzima DNAsa se realiza mínimo en 1 horas; además de ayudar a verificar las colonias positivas de matrices como la sangre.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar una nueva contaminación artificial, y además el inicio para una ronda de verificación interlaboratorios con este método ya que Colanta® es poseedor de una infraestructura que puede soportar estos tipos de estudio.

Seguir cuidadosamente la metodología del análisis para evitar a errores que afecten los resultados y su credibilidad

Seguir con el ensayo para buscar el cambio de metodología, en la identificación y enumeración de ***Staphylococcus aureus*** coagulasa positivo en matrices cárnicas.

9. BIBLIOGRAFIA.

- AOAC INTERNATIONAL. AOAC Official Method 2003.11. Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Meat, Sea food, and Poultry 3MTM Petrifilm™ Staph Express Count Plate Method. AOAC, 2007: il. (AOAC 2003.11.).
- AOAC INTERNATIONAL. AOAC Official Method 975.55. for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected foods.. AOAC, 1976: il. (AOAC 975.55).
- BETANCUR, O; Betancourt, A; Henao, J; y Estrada, F. Persistencia de patógenos en porcínaza líquida procesada en tanques estercoleros y biodigestores/En. Revista MVZ Córdoba, vol. 21, núm. 1, enero-abril, 2016, pp. 5237-5249. Cordoba, Colombia.
- COLANTA. (A). Frigocolanta. [en línea].< <http://www.frigocolanta.com>> [citado el 20 de Marzo del 2016]
- COLANTA. (B) Manual de procedimientos Frigocolanta.En: Procedimientos microbiológicos. [Impreso en Zeta]; Vol 1. pp. 21-28. citado el 26 de Mayo del 2016. Documento privado.
- COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA RIESGOS SANITARIOS. (Cofepris) Guía para la evaluación de desempeño de métodos de prueba microbiológicos para el análisis de alimentos. [en línea]. < <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/CCAYAC-P-062-1.pdf>>. [citado el 24 de mayo del 2016]
- CUELLAR, D. Verificación del método para la enumeración y confirmación de *Staphylococcus aureus* en Petrifilm™, en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano. Honduras, 2015, 50 h. Trabajo de grado (Agroindustria Alimentaria) Escuela Agrícola Panamericana. Facultad de ingenierías.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Bacteriological Analytical Manual. VA: AOAC: 9th ed. Arlington, 2003.

- FORNES, D. Requisitos y aspectos prácticos para validar y aplicar métodos alternativos en el laboratorio de microbiología, ainia, En. Revista ainia. Vol. 1, núm. 1, 26 de noviembre, 2008, pp. 1-13.España.
- FUENTES, S; MORENO, E. Evaluación de riesgos de ***staphylococcus aureus*** enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia /En: Instituto Nacional de Salud (INS), 2011. Bogota. Colombia.
- GONZÁLEZ, M; MARTÍNEZ, C; ZHURBENKO, R. Validación de métodos alternativos para análisis de alimentos y agua. Metodos cuantitativos./En. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 2010; Vol 48(2), pp. 162-176. Ciudad de La Habana, Cuba.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION. practical guidelines on performance testing of culture media. ISO, 2002. (ISO 11133-2).
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods. ISO, 2003. (ISO 16140).
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION. REQUISITOS GENERALES PARA LA COMPETENCIA DE LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACION. ISO, 2005. (ISO 17050).
- JACÓ DE SOUZA, L; COSTA, A; NERO, A; COUTO, P. Y FERREIRA DE AGUIAR, M. Evaluation of Petrifilm™ system compared with traditional methodology in count of indicators of sanitary-hygienic quality and pathogenic microorganisms in sheep milk./En. Revista SCIELO.BR. 2015; Vol 35(2): PP 375-379. Campinas-Brazil.
- JUKES, L; MIKHAIL, J; BOME MANNATHOKO, N; HADFIELD, S. J; HARRIS, L. G; EL-BOURI, K. Rapid differentiation of ***Staphylococcus aureus***,***Staphylococcus epidermidis*** and other coagulase-negative staphylococci and meticillin susceptibility testing directly from growth-positive blood cultures by multiplex real-time PCR.2010./En revista: Journal of Medical Microbiology, pp. 1456–1461.

- MCCARRON, J; KEEFE, G; MCKENNA, S; DOHOO, I; Y POOLE, D. Evaluation of the University of Minnesota Tri-plate and 3M Petrifilm for the isolation of Staphylococcus aureus and Streptococcus species from clinically mastitic milk samples./En revista: ScienceDirect. 2009; Vol 92 (10), pp5326-2333. Minnesota-EEUU.
- MERCK. Merck Microbiology Manual, 12th Edition, pp 186-187; Alemania.
- MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. DIARIO OFICIAL 48.699, 9 de Febrero de 2013. (RESOLUCIÓN NÚMERO 0000240).
- NOGUEIRA, V; MORAES, M; KEIZO, Y; & NERO, L. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive Staphylococcus spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system./En revista: ScienceDirect. 2009; Vol 24 (4), pp 447-457. Viçosa, Brazil.
- PADILLA, J. Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de Bacillus cereus y Staphylococcus aureus en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia. Bogotá, 2007, 109 h. Trabajo de grado (Microbiólogo Industrial) Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. departamento de Microbiología Industrial.
- ROJAS, L y CLAVIJO, C. Guía de laboratorio de microbiología de carnes y pescados. 2010. Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia.
- SÁNCHEZ, C; DE LA CRUZ, R; y LASO, J. Precisión de los métodos cuantitativos en microbiología. comparativa de distintas./En Revista. IBEROLAB, 2011. Vol. VI, pp, 1-6. Madrid, España.
- SANTOS, A. Comparação entre os meios de cultura baird-parker, baird parker– rpf e petrifilm™ staph express na detecção de staphylococcus coagulase positivo em leite cru naturalmente contaminado e em leite esterilizado inoculado com culturas específicas. 2 008, 53 h. Trabajo de grado (Maestría en Ciencia Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte-brazil

SENASA. (2010). Recuento de ***Staphylococcus aureus*** Coagulasa positiva. Costa Rica: SENASA.

TERAMURA, H; MIZUOCHI, S & KODAKA, H. Evaluation of the compact dry X-SA method for enumerating *S. aureus* in artificially contaminated food samples./En revista: Biocontrol Science. 2010. Vol. 15 (4), pp, 149-154. Japon.

VALLE, M. Evaluación de la calidad e inocuidad microbiológica de muestras de carne de res, pescado y pollo, expendidas en un mercado popular del área metropolitana de Caracas. 2013, 87 h, Trabajo de grado (Licenciado en Biología) Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

ZENDEJAS, G; AVALOS, H & SOTO, M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades,patogenicidad y métodos de identificación. /En Revista: Biomed. 2014. vol 25: pp: 129143. Estado de Michoacán de Ocampo, México.

3M. Guía de interpretación; Placas Petrifilm™ Staph Express de 3M™ para Recuento de *Staphylococcus aureus*. 2007.Mexico.

10. ANEXOS.

Anexo 1. Tablas de resultados de la contaminación artificial.

Tabla 10. Nivel de contaminación media 10^2 (10-100 ufc).

Matriz	Baird Parker (ufc/g)				Petrifilm™ Staph Express (ufc/g)			
	Duplicado 1	Duplicado 2	Media	Log	Duplicado 1	Duplicado 2	Media	Log
CT	39	36	37,5	1,57403127	40	35	37,5	1,57403127
CC	1	1	1	0	3	3	3	0,47712125
MON	1	1	1	0	3	2	2,5	0,39794001
CHCH	6	2	4	0,60205999	3	1	2	0,30103
BCH	21	19	20	1,30103	13	12	12,5	1,09691001
LT	16	15	15,5	1,1903317	53	52	52,5	1,7201593
BAZR	2	2	2	0,30103	7	6	6,5	0,81291336
CABR	2	2	2	0,30103	4	2	3	0,47712125
ASC	14	13	13,5	1,13033377	19	16	17,5	1,24303805
CABC	2	2	2	0,30103	4	3	3,5	0,54406804
MAD	6	4	5	0,69897	5	5	5	0,69897
CR	2	0	1	0	3	2	2,5	0,39794001
ORC	12	11	11,5	1,06069784	14	12	13	1,11394335

Tabla 11. Nivel de contaminación baja 10^1 (1-10 ufc).

Matriz	Baird Parker (ufc/g)				Petrifilm™ Staph Express (ufc/g)			
	Duplicado 1	Duplicado 2	Media	Log	Duplicado 1	Duplicado 2	Media	Log
CT	9	7	8	0,90308999	11	8	9,5	0,97772361
CC	4	2	3	0,47712125	7	6	6,5	0,81291336
MON	1	1	1	0	3	1	2	0,30103
CHCH	1	1	1	0	3	2	2,5	0,39794001
BCH	12	10	11	1,04139269	10	7	8,5	0,92941893

LT	1	1	1	0	7	5	6	0,77815125
BAZR	1	0	0,5	-0,30103	9	8	8,5	0,92941893
CABR	1	0	0,5	-0,30103	1	1	1	0
ASC	16	13	14,5	1,161368	20	18	19	1,2787536
CABC	1	1	1	0	1	1	1	0
MAD	1	1	1	0	3	1	2	0,30103
CR	1	0	0,5	-0,30103	1	0	0,5	-0,30103
ORC	7	7	7	0,84509804	12	10	11	1,04139269

Anexo 2. Registro de los medios de cultivo utilizados.

Medio	Lote	Fecha de caducidad	de Marca
Baird Parker	VM632806-415	20/03/2019	MERCK
Stamp express	6475/6477	01/08/2016	3M
Agua peptonada	K42786804	20/03/2019	MERCK
Patrón macfarlán N°1	NA	15/04/2017	Johana Castillo
Caldo BHI	VM665493-447	21/10/2019	MERCK

Anexo 3. Lista de equipos utilizados.

Equipo	Marca	Calibración	Mantenimiento
Estufa de incubación	MEMMERL	2015-12-17	2016-06-17
Balanza analítica	METTLER TOLEDO	2016-04-02	2016-10-02
Pipeta electrónica	3M	NA	NA
Cuenta Colonias	Leica (3325)	NA	NA
Cabina de bioseguridad	Pc4PASCAL	2015-05-20	2017-05-20
Stomacher	AES	NA	NA

Anexo 4. Analistas que participaron en la evaluación de desempeño

Bacterióloga. Nataly Blandón Aguirre; Analista A Bacteriología/FRIGOCOLANTA LTDA.

Microbiólogo. Edward Fernando Capacho; Practicante /FRIGOCOLANTA LTDA.