

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP) PARA  
*Staphylococcus aureus* COAGULASA POSITIVA EN MUESTRAS DE LECHE CRUDA  
COMO INDICADOR DE CALIDAD.

ANDREA LÓPEZ AGUIRRE  
GERMÁN DAVID URIBE PALACIO

TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito para optar al título de

Microbiólogo

UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL PEREIRA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA  
Pereira, Risaralda  
2015



## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. MARCO TEÓRICO
  - 2.1 Características de la leche cruda
  - 2.2 Análisis microbiológico de la leche
  - 2.3 Descripción microorganismo de estudio
    - 2.3.1 *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva
  - 2.4 Descripción método de estudio
    - 2.4.1 Método de número más probable (NMP) para *Staphylococcus aureus*
  - 2.5 Generalidades sobre la validación
    - 2.5.1 Validación
      - 2.5.1.1 Validación primaria
      - 2.5.1.2 Validación secundaria
  - 2.6 Parámetros de desempeño de la validación
    - 2.6.1 Reproducibilidad
    - 2.6.2 Repetibilidad
    - 2.6.3 Especificidad
    - 2.6.4 Precisión
    - 2.6.5 Linealidad
    - 2.6.6 Sensibilidad
  - 2.7 Análisis microbiológico de alimentos
    - 2.7.1 Plan de muestreo (recolección y/o recepción de muestras)

2.7.2 Técnicas de muestreo (tratamiento de la muestra)

### 3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

#### 4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

4.2 Objetivos específicos

#### 5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Control de calidad en medios de cultivo

5.1.1 Control macroscópico

5.1.2 Control de pH

5.1.3 Control de esterilidad

5.1.4 Prueba de selectividad y reproducibilidad

5.1.4.1 Método ecométrico

5.1.5 Control de ambientes

5.1.6 Control de equipos

5.2 Verificación de los métodos

5.2.1 Análisis de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva en muestras de leche

5.2.1.1 Método de enumeración

5.2.1.2 Medios de cultivo, soluciones, reactivos para propiedades bioquímicas y equipos

5.3 Procedimiento

5.3.1 Dilución y homogeneización de la muestra

5.3.2 Recuento en placa en superficie de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

### 5.3.2.1 Confirmación: prueba de la coagulasa

## 5.4 Expresión de resultados

### 5.4.1 Método de enumeración

#### 5.4.1.1 Selección de la dilución

#### 5.4.1.2 Selección de resultados positivos para el cálculo de número más probable (NMP)

## 5.5 Cálculo y expresión de resultados

### 5.5.1 Número más probable (NMP) de *Staphylococcus aureus*

## 6. CONCLUSIONES

## 7. ANEXOS

## 8. REFERENCIAS

## RESUMEN

Los microorganismos indicadores de calidad en leche son utilizados principalmente para determinar el crecimiento de patógenos que puedan afectar la calidad de los productos lácteos, *Staphylococcus aureus* es utilizado como microorganismo indicador de calidad en leche, ya que puede determinar la presencia de microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes* que disminuyen la calidad de los productos lácteos; causando con ello pérdidas económicas en el sector lechero. Se determinará la presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva para validar el método de número más probable (NMP) en leche cruda de muestras tomadas de los 14 municipios del departamento de Risaralda.

## 1. INTRODUCCIÓN

La leche ha sido un alimento de gran importancia para el hombre desde la domesticación de los animales y el comienzo de la agricultura de pastoreo. La leche y sus derivados pertenecen al grupo de alimentos de mayor riesgo en la salud pública, ya que sus características de composición favorecen la proliferación microbiana (1)(2). La leche es un producto natural cuyo origen en la glándula mamaria es normalmente estéril o con muy baja carga bacteriana, pero en la práctica es difícil mantener esas condiciones y la contaminación siempre va a estar presente al ser obtenida de la ubre de la vaca (3)(4). La leche cruda puede variar su composición entre diferentes especies y dentro de la misma especie por efecto de factores relacionados con la raza, intervalo entre ordeños, cuartos de la ubre, estaciones climáticas, alimentación, enfermedades, temperatura ambiental, edad (etc.) (5)(6). La calidad de la leche cruda puede deteriorarse debido a un manejo inadecuado de los utensilios de ordeño, transporte o adulteración, aumentando la carga bacteriana y propiciando propiedades indeseables de acidez, rancidez o agriado (7)(6). Entre el aumento por carga microbiana, el principal factor de enfermedades en bovinos se da por mastitis bovina; la mastitis bovina es una inflamación en el área de las glándulas mamarias que es debido principalmente a una infección microbiana (8)(9). Esta infección microbiana es la causa más importante de pérdidas en la industria de los lácteos, y se deben principalmente a la baja producción, baja calidad y altos costes de producción; aunque varios patógenos bacterianos pueden causar la enfermedad (10)(11).

*Staphylococcus aureus* es el principal agente responsable de la mastitis contagiosa bovina, y es muy difícil de erradicar dada la amplia gama de factores de virulencia que contribuyen a la capacidad de las bacterias para sobrevivir en el huésped (12)(13). *Staphylococcus aureus* es un microorganismo muy patógeno, responsable de un espectro amplio de manifestaciones clínicas, que van desde infecciones cutáneas superficiales como forunculosis y foliculitis, hasta infecciones graves como neumonía necrosante, osteomielitis, bacteriemias y endocarditis, este se caracteriza; además, por poseer una enorme capacidad de adaptación a los antimicrobianos adquiriendo mecanismos de resistencia a la mayoría de ellos, en particular a la meticilina, lo que complica aún más el contexto (14)(15)(16). *Staphylococcus aureus* en leche cruda, funciona como correcto indicador de calidad, este es determinado por el método de número más probable (NMP), siendo este un método de detección principal en el control de la calidad microbiológica; este método indicador funciona para detectar otros microorganismos que alteran la calidad de los alimentos como los mesófilos aerobios, hongos y levaduras, patógenos como *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*; en los que otros métodos detectan e identifican los microorganismos anteriormente dichos en la validación dentro de un laboratorio (17)(18).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Características de la leche cruda

La leche cruda está compuesta principalmente por agua, proteína, grasa, lactosa, vitaminas y minerales. Estos componentes son los que determinan la calidad de la leche cruda y pueden variar según la raza del animal, las condiciones ambientales y el tipo de alimentación que se le ofrezca al animal. La proporción de agua en la leche cruda varía entre el 85,3 y 88,7% (p/p), con proteína equivale entre 2,3 y 4,4 % (p/p) y la lactosa entre 3,8 y 5,3%. La grasa fluctúa entre 2,5 a 5,5% (p/p), y es considerada la variable más importante para la industrialización de la leche; un porcentaje más alto de grasa, indica que leche cruda es de alta calidad, además es una variable que incrementa el valor económico de la leche cruda (4)(19).

### 2.2. Análisis microbiológico de la leche

Para que la leche cumpla con los estándares de calidad indicados para el consumo humano es necesario que la calidad de la leche provenga del ordeño de vacas sanas bien alimentadas, con cantidad y calidad apropiada de componentes sólidos como la grasa, la proteína, la lactosa, las vitaminas y los minerales libre de olores, sedimentos, sustancias extrañas, residuos químicos e inhibidores, libre de bacterias causantes de enfermedad, y con un mínimo de carga microbiana y células somáticas (20)(10). La inocuidad de la leche cruda, se mide según el número de bacterias por mililitro de leche en ausencia de inhibidores microbianos y el conteo de células somáticas con respecto a la contaminación de la leche por bacterias, esta inicia con una flora que se encuentra adherida a la pared del canal del pezón y concluye con los microorganismos presentes en el ambiente que entran en contacto con la leche después de ser extraída de la ubre; estos inhiben su crecimiento a los 4°C. Por último, el contenido de células somáticas en la leche, se relaciona con la inflamación de la glándula mamaria, producto de un golpe, desarrollo de patógenos o a un mal manejo del ordeño, instalaciones inadecuadas y al proceso en general del ordeño (12)(4).

### 2.3. Descripción microorganismo de estudio

#### 2.3.1. *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

*Staphylococcus aureus* se caracteriza por ser coco Gram positivos de 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, generalmente se encuentran microscópicamente aislados en pares, tétradas o formando racimos irregulares. Es positiva para catalasa y la catalasa que genera convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Tiene la función de reducción de nitratos. Se



reproduce asexualmente por fisión binaria. Son inmóviles, facultativamente anaerobios, no formadores de esporas, generalmente no capsulados o con limitada formación de cápsula (21)(22). Este microorganismo coloniza con frecuencia la piel y membranas mucosas sin causar infección y no invade la piel sana, pero mínimas roturas de la barrera cutáneo-mucosa le permiten penetrar en los tejidos y causar una gran variedad de infecciones y cuadros clínicos debidos a la producción de toxinas. La coagulasa es secretada en forma extracelular y reacciona con una sustancia presente en el plasma denominada “factor de reacción con la coagulasa (CRF)” para formar un complejo que, a su vez, reacciona con el fibrinogeno para formar fibrina (formación de coágulos) (23)(24).

Casi todas las cepas producen un grupo de enzimas y citotoxinas que incluyen 4 hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta) nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasa; y la principal función de estas proteínas sería convertir tejidos del huésped en nutrientes requeridos para el desarrollo bacteriano (26). Los factores de virulencia pueden dividirse en tres categorías funcionales: factores que median la adhesión de las bacterias a las células huésped; aquellos que producen daño en los tejidos; y aquellos que protegen contra las bacterias y los antibióticos sistema inmune del huésped (27)(15).

La adhesión a las células epiteliales es el paso inicial en el proceso de la infección por *S. aureus*; la unión a diversos componentes de la matriz extracelular, tales como el fibrinógeno, fibronectina y colágeno permiten que las bacterias colonicen los tejidos dañados y, Factor de aglutinación A, se considera uno de los más importantes factores de adhesión y se ha identificado como un factor de virulencia en un modelo de endocarditis (27)(14).

*S. aureus* producen una amplia variedad de exoproteínas, incluyendo hemolisinas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar la enfermedad en huéspedes mamíferos (25)(21); por ejemplo, la  $\alpha$ -hemolisina es el más estudiado de las citotoxinas en *S. aureus*, la toxina  $\beta$  es una esfingomielinasa expresado por la mayoría de las cepas aisladas de infecciones bovina intramamaria, pero rara vez por los aislados humanos. Se ha informado de que ambas toxinas aumentan la adherencia de *S. aureus* a las células epiteliales mamarias (8).

La cápsula ha demostrado promover la virulencia de *S. aureus* en varios modelos animales de infección. Las cepas de *S. aureus* encapsuladas son más resistentes a la fagocitosis de cepas no encapsuladas, y permitir que las bacterias permanezcan en los huéspedes infectados. A pesar de que la producción de factor de virulencia de *S. aureus* ha sido ampliamente descrito, muy pocos estudios se han hecho donde describen la virulencia principal de factores fenotípicos de las cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina (27)(12).

## 2.4. Descripción método de estudio

### 2.4.1. Método de número más probable (NMP) para *Staphylococcus aureus*

Este número es calculado a partir de la observación del crecimiento respecto a la aparición de turbidez, en cultivos en caldo duplicados, inoculados con porciones de un ml de diluciones decimales de la muestra. Las cifras que representan resultados positivos con crecimiento en tres diluciones sucesivas, suelen denominarse número significativo (28). El método de NMP consiste principalmente en determinar la presencia o ausencia sea positiva o negativa de atributos específicos de microorganismos en copias obtenidas por diluciones consecutivas a partir de muestras de lácteos. Se basa en el principio de que una única célula viva puede desarrollarse y producir un cultivo turbio (29).

El método requiere la realización de una serie de diluciones en serie de la muestra de cultivo, en un medio líquido adecuado para el crecimiento de dicho organismo de un volumen diez veces mayor. Luego, se incuban las muestras de esos tubos y, pasado un tiempo, se examinan los tubos. Aquellos tubos que recibieron una o más células microbianas procedentes de la muestra, se pondrán turbios, mientras que los tubos que no recibieron ninguna célula permanecerán transparentes (30).

El NMP para *Staphylococcus aureus* funciona específicamente para recuperar células estresadas de *S. aureus* utilizando cloruro de sodio que actúa como agente selectivo para *S. aureus* permitiendo el desarrollo de este microorganismo e inhibiendo la flora acompañante. El piruvato de sodio actúa para prevenir la muerte celular por la acumulación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) durante el desarrollo aeróbico. El piruvato aumenta la recuperación de células estresadas ya que actúa como intercambiador en la degradación del  $H_2O_2$  (31).

## 2.5. Generalidades sobre la validación

### 2.5.1. Validación

Se fundamenta en establecer evidencia documentada que suministre un alto grado de aseguramiento de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que cumpla con sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados (32)(33). También la validación debe confirmar que el método se comporta de forma adecuada en todo el rango de concentración habitual y en las matrices de ensayo a realizar; por ello, es necesario especificar las características antes de realizar la validación (34). Es esencial,

entonces el conocer el método a validar y su aplicabilidad; es decir, su analito, concentración y la matriz en las cuales se desea utilizar (35)(36).

Validar un proceso se fundamenta en realizar sistemáticamente los procesos de puesta a punto del mismo, mediante el seguimiento de las siguientes fases (37):

- Planificación: Busca constituir programas temporales y listas de verificación o protocolos de validación con criterios de aceptación/rechazo, análisis de riesgos, necesidades de recursos, etc.
- Calificación del diseño: La evaluación de nuevas instalaciones, sistemas o equipos es el primer elemento de la validación. Se deberá demostrar y documentar la adecuación del diseño a las Normas de Correcta Fabricación.
- Calificación de la instalación: Esta se deberá hacer en caso de instalaciones, sistemas y equipos nuevos o modificados. La calificación de la instalación incluirá, entre otras cosas, lo siguiente:
  - Demostración de la instalación de equipos, conducciones, servicios e instrumental respecto a diagramas y especificaciones actualizadas de Ingeniería.
  - Recopilación de las instrucciones de operación y funcionamiento del proveedor y de las exigencias de mantenimiento.
  - Requisitos de calibración

La calificación del funcionamiento al finalizar de forma satisfactoria, permitirá terminar los procedimientos de calibración, fabricación y limpieza, la formación del operario y las exigencias de mantenimiento preventivo. Así, permitirá la aprobación formal de las instalaciones, equipos y sistemas (37).

- Calificación de la ejecución del proceso: Deberá realizarse una vez terminadas favorablemente la calificación de la instalación y de funcionamiento. La calificación del proceso incluirá, entre otras cosas, lo siguiente:
  - Ensayos, empleando materiales de producción, componentes sustitutivos calificados o simulaciones del producto, que se hayan desarrollado a partir del conocimiento sobre los procesos y las instalaciones, equipos o sistemas,
  - Ensayo que incluya un conjunto de ellas o una situación que contengan los límites máximos y mínimos de funcionamiento.

#### 2.5.1.1. Validación primaria

La validación primaria es el establecimiento de especificaciones para el desempeño de un nuevo método y/o verificación experimental de que un método cumple criterios de calidad derivados teóricamente (38)(35). El criterio de esta tipo de validación tiene como objetivo importante el proporcionar toda la información posible respecto a un nuevo método, objeto de estudio, recobrado y/o enumeración del microorganismo diana, rangos óptimos de concentraciones del microorganismo en la muestra donde se obtengan los resultados más satisfactorios, la selectividad y especificidad (falsos positivos y negativos), incertidumbre de recuento (metodología y analista), y un estimado general de precisión. También, se pueden analizar los requerimientos del método como tiempo y temperatura de incubación, pre-tratamiento de la muestra, preparación de medios y condiciones de almacenamiento (34)(38).

#### 2.5.1.2. Validación secundaria

La validación secundaria es la demostración, mediante experimentos, de que un método establecido funciona de acuerdo con sus especificaciones, cuando lo emplea un usuario. Otra manera de llamarse es Verificación y es la confirmación, mediante el aporte de pruebas objetivas, de que se han cumplido los requisitos establecidos (35)(38). El propósito de la validación secundaria es establecer si el nuevo método satisface realmente las necesidades del laboratorio, esta fase es controlada y organizada por un laboratorio experto, pero se desarrolla en otros laboratorios colaboradores y tiene como objetivo principal observar el comportamiento del método utilizando muestras comunes, así como situaciones que pueden ocurrir cuando el uso del método sea extendido a la práctica (38)(34). Habitualmente, la validación secundaria utiliza formas simplificadas y seleccionadas de los mismos procedimientos manejados en la validación primaria, aunque posiblemente extendidas por un mayor tiempo.

#### 2.6. Parámetros de desempeño de la validación

Para llevar a cabo la validación, es necesaria la versión final del método desarrollado, bajo condiciones de operación definidas; del mismo modo puede ser necesario realizarla en etapas previas del proceso de desarrollo. Si hay otros usos previos para el método, se debe llevar a cabo múltiples validaciones. Estos parámetros son las propiedades, capacidades o características del método en cuanto a exactitud, precisión, reproducibilidad, repetibilidad, sensibilidad y linealidad, entre otros parámetros (39)(40).

2.6.1. Reproducibilidad: Grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo analito realizadas en diferentes condiciones de medición. Una declaración vital de reproducibilidad requiere que se especifiquen los cambios en las condiciones del analista o calibración. Estos cambios pueden incluir: el principio en que se basa la medición, el método, analista/observador e instrumento, material y patrones de referencia, ubicación, condiciones de uso y tiempo. La reproducibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de los parámetros de dispersión de los resultados (desviación estándar, varianza, coeficiente de variación) (40).

2.6.2 Repetibilidad: Grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo analito, realizadas en las mismas condiciones de medición. Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento, analista/observador, ubicación, instrumento y condiciones de medición. Por mediciones sucesivas se entiende aquellas mediciones repetidas dentro de un corto período de tiempo. La repetibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de los parámetros de dispersión de los resultados (desviación estándar, varianza, coeficiente de variación). A la repetibilidad también se le conoce como precisión intraensayos o intracalibraciones (40).

2.6.3. Especificidad: Capacidad de un método de determinar inequívocamente un analito/parámetro en presencia de los otros componentes de la muestra (40). La especificidad puede ser afectada por la presencia de interferentes como precursores de síntesis, impurezas, productos de degradación, entre otros. En microbiología, especificidad se define como la fracción del número total de cultivos o colonias negativas que son asignados correctamente con el método utilizado (39).

2.6.4. Precisión: Grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas. La precisión puede ser considerada a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Dicho de otra forma, es la distribución de los valores analíticos alrededor de la media, que puede ser expresada en términos de varianza, desviación estándar o coeficiente de variación (parámetros de dispersión) (40).

2.6.5. Linealidad: Capacidad de un método analítico para generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito o valor del parámetro de la muestra, dentro de un rango (40).

2.6.6. Sensibilidad: En microbiología, sensibilidad se define como la fracción del número total de cultivos o colonias positivos que son asignados correctamente con

el método utilizado. También se define como el cambio de la respuesta del sistema de medición en función del cambio de la concentración del analito (40).

## 2.7. Análisis microbiológico de alimentos.

### 2.7.1. Plan de muestreo (Recolección y/o recepción de muestras)

Generalmente el plan de muestreo incluye un procedimiento de muestreo y los criterios decisorios que han de aplicarse al lote, basándose en el examen del número prescrito de unidades de la muestra y de las unidades analíticas subsiguientes del tamaño indicado en los métodos determinados. El adecuado diseño de este define la probabilidad de detección de microorganismos en un lote, pero debe tenerse en cuenta que ningún plan de muestreo puede asegurar la ausencia de un determinado organismo. Los planes de muestreo deberán ser administrativa y económicamente factibles (41)(37).

En particular, la selección de planes de muestreo deberá tener en cuenta:

- Los riesgos para la salud pública asociados con el peligro.
- La susceptibilidad del grupo de consumidores destinatario.
- La heterogeneidad de distribución de los microorganismos cuando se utilizan planes de muestreo con variables.
- El nivel de calidad aceptable y la probabilidad estadística deseada de que se acepte un lote que no cumple con los requisitos

El método de muestreo deberá definirse en el plan de muestreo. El tiempo que transcurra entre la toma de las muestras de campo y su análisis deberá ser lo más breve razonablemente posible y, durante el transporte al laboratorio, las condiciones (como por ejemplo, la temperatura) no deberán permitir que aumente o disminuya la cantidad del organismo de que se trata, de forma que los resultados reflejen –dentro de las limitaciones establecidas en el plan de muestreo – las condiciones microbiológicas del lote (33).

### 2.7.2. Técnica de muestreo (Tratamiento de la muestra)

Inicialmente la muestra debe de estar rotulada de manera adecuada, con la firma o las iniciales del personal de muestreo; el informe deberá presentar los siguientes detalles:

- Lugar, fecha y hora de muestreo

- Nombres y designaciones del personal de muestreo
- Método de muestreo preciso; si hay diferencia con respecto a la norma NTC 666
- La naturaleza y el número de unidades que constituyen el envío, junto con los códigos de los lotes, si se utilizan
- Número de identificación y el código del lote donde se tomaron las muestras
- De ser necesario, el sitio al cual se van a enviar las muestras
- Si es posible, el nombre y dirección del productor o comerciante, o las personas responsables del empaque del producto.

Los materiales y constituyentes de los recipientes para la muestra deberán brindar una protección adecuada y no provocar cambios en la muestra que puedan afectar los resultados de los análisis posteriores. El tiempo para el envío de las muestras al laboratorio deberá ser el menor posible, preferiblemente un máximo de 24 h. El producto (leche cruda líquida no esterilizada) se deberá almacenar en el transporte a una temperatura 0°C a 4°C, en un tamaño mínimo 100ml (18).

### 3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En Colombia, existen diversas fuentes de alimentación pecuaria, la leche es uno de los alimentos más importantes a nivel económico en países ganaderos, gracias a la gran cantidad de nutrientes que poseen los productos lácteos, estos se convierten en la principal fuente de almacenamiento de microorganismos (42). Las prácticas realizadas por los ordeñadores generalmente no están vigiladas y al no cumplir con los estándares de calidad apropiados, los productos lácteos obtienen gran cantidad de microorganismos patógenos que pueden alterar las capacidades organolépticas del producto, así como la salud de los consumidores (43)(44). Por ello, se busca realizar procedimientos en los laboratorios de análisis; sean de alimentos, fármacos o cosméticos, que impliquen una reducción de costos, menor gasto de tiempo, confiabilidad en los resultados y aún más importante es el tratar de cumplir requisitos, sean normativos gubernamentales o los que permiten el reconocimiento en laboratorios; como las NTC o ISO, el cual al llevarse a cabo permite en cumplimiento y promueve la acreditación de un laboratorio. El logro de estas acreditaciones por medio de las normas NTC o ISO, se debe de tener en cuenta respecto a la variedad del procedimiento a seguir, dentro los que se encuentra la estandarización y documentaciones técnicas y/o métodos de análisis que se dan lugar dentro del laboratorio.

De lo anterior se justifica que es imprescindible el implementar la validación de los métodos más frecuentes en los laboratorios utilizados para el análisis, dentro del que se encuentra microorganismos que puedan alterar la calidad de alguna materia prima, como la detección de *Staphylococcus aureus* en leche cruda, que es realizado por el método de número más probable (NMP), siendo este un método de detección principal en el control de la calidad microbiológica; sin dejar al lado otros microorganismos que alteran la calidad de los alimentos como los mesófilos aerobios, hongos y levaduras, patógenos como *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*; en los que otros métodos detectan e identifican los microorganismos anteriormente dichos en la validación dentro de un laboratorio.

Es por ello que para realizar la validación del método de número más probable (NMP) para la identificación de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, se analizarán muestras de leche cruda, la cual es materia prima de muchos derivados lácteos, estando presente en la leche cruda por la inadecuada práctica de ordeño por parte de los ordeñadores o la no limpieza y desinfección adecuada de los equipos de ordeño automático



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

- Realizar la validación del método de número más probable (NMP) para la identificación y recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, en muestras de leche cruda como indicador de calidad.

### 4.2. Objetivos específicos

- Identificar la presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva en leche cruda por el método de número más probable (NMP).
- Evaluar la repetibilidad de la técnica de número más probable (NMP) en muestras de leche cruda mediante 3 repeticiones sucesivas realizadas en las mismas condiciones de medición.
- Evaluar la reproducibilidad de la técnica de número más probable (NMP) en muestras de leche cruda mediante 3 repeticiones sucesivas realizadas en diferentes condiciones de medición.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para poder llevar a cabo la validación de la técnica de número más probable (NMP) para la identificación de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, es necesario realizar pruebas para evaluar los medios de cultivo a trabajar, la verificación de los equipos y la documentación de todo el proceso de validación del método. El tipo de estudio a realizar es descriptivo – analítico, con un aproximado de 30 muestras aleatorias simples y se realizará en las instalaciones de la Universidad Libre seccional Pereira, en los Laboratorios de Microbiología y Fisicoquímica.

Para llevar a cabo la validación del método se procederá de muestras de leche cruda, recolectadas de hatos lecheros certificados y no certificados de los diferentes municipios del departamento de Risaralda tomada por técnicos de saneamiento de la Secretaría de Salud de Risaralda, Colombia, a las cuales se les realizará el análisis de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva por número más probable (NMP) de acuerdo al protocolo descrito por ISO 6888-3: 2003(corrección 2004) (41) que se explicará a continuación:

### 5.1. Control de calidad de medios de cultivo

Los medios de cultivos a utilizar en los ensayos de laboratorio deben pasar por diferentes controles, en los que están incluidos: control macroscópico, control de pH, control de esterilidad y control de eficacia, en los que se medirá la productividad y selectividad del medio del cultivo mediante evaluación por método ecométrico.

#### 5.1.1. Control macroscópico

Se realizará mediante un examen visual en la consistencia del medio (líquida o sólida), su color y apariencia (transparente, turbio, con o sin precipitado) y si estas descripciones corresponden a las especificaciones del medio con la ficha técnica de estos.

#### 5.1.2. Control de pH

Se tomará de la muestra del medio preparado a una temperatura determinada y se introducirá en el pHmetro. El valor que arroje debe corresponder al indicado en la ficha técnica del medio.

#### 5.1.3. Control de esterilidad

Se servirán cajas petri con el medio Baird Parker y demás a utilizar, del total de las cajas o tubos se retirarán el equivalente al 10% de la totalidad de ellas.

#### 5.1.4. Prueba de selectividad y productividad

En un medio de cultivo, su composición química debe proveer los requerimientos nutricionales básicos para los microorganismos, sin embargo un medio de cultivo debe de cumplir con dos características importantes:

- **Productividad:** Esta hace referencia a la formulación básica del medio, de tal manera que favorezca el crecimiento de microorganismos con las características microscópicas y macroscópicas esperadas. La productividad es una variable de interés ya que se trabaja con ella en el desarrollo de nuevos medios, por lo que se espera que los aportes nutricionales sean equilibrados para obtener el crecimiento y la producción de metabolitos de interés.
- **Selectividad:** Este hace referencia a la formulación del medio respecto a su capacidad de excluir o eliminar microorganismos acompañantes e indispensables que pueden de alguna manera obstaculizar el crecimiento de los microorganismos objeto de análisis.
- **El análisis ecométrico** establece la eficiencia con la cual un medio de cultivo es adecuado para recuperar una cepa o aumentar la inducción de crecimiento y desarrollo, mediante la comparación que se realiza entre el microorganismo que crece fácilmente en el medio (referencia o prueba) y un microorganismo que no crece en el medio (interferente).

#### 5.1.4.1. Método ecométrico:

- Se preparará una suspensión del microorganismo prueba y una del microorganismo interferencia en solución salina y se llevará a una concentración aproximada al tubo 1 de la escala de Mc Farland ( $3 \times 10^8$ )
- Se tomará los medios pruebas (agar Baird Parker y caldo infusión cerebro corazón) y el medio control (Agar tripticasa de soya)
- Se dividirá la base de los medios en 4 cuadrantes.
- Con un asa calibrada se tomará el microorganismo blanco y se sembrará por estrías (5 en cada cuadrante y una en el centro de la caja) sin retomar muestra, en el medio de prueba.
- Con un asa calibrada se tomará el microorganismo interferente y se seguirá el mismo procedimiento de siembra en la segunda caja del medio de prueba y posteriormente en el medio control.

- Se llevará a incubar a 37° C +/- 2 durante 48 horas (33).

Medio de cultivo Baird Parker para prueba ecométrica.

Microorganismo de referencia: *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

Microorganismo de interferencia: *Escherichia coli*

Medio de control: Agar tripticasa de soya

Temperatura de incubación: 37°C +/- 2

Tiempo: 48 horas

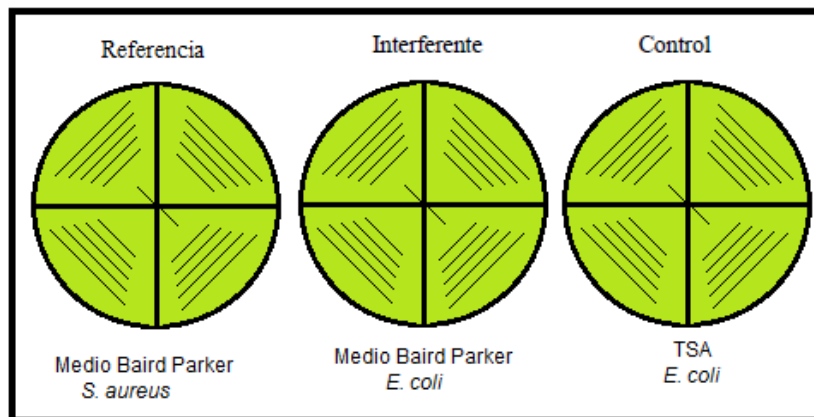


Figura 1. Método ecométrico para Medio Baird Parker de *Staphylococcus aureus*

#### 5.1.5. Control de ambientes

Durante el proceso de validación, es necesario llevar a cabo control de ambiente por el método de sedimentación, en medio, Plate Count para mesófilos aerobios y Sabouraud para hongos y levaduras.

#### 5.1.6. Control a equipos

Es de suma importancia que durante el proceso de validación de métodos microbiológicos llevar a cabo el debido mantenimiento y calibración de los equipos de los que se hará uso diario para la realización de dichos métodos.

Para la muestra se realizará los análisis de repetibilidad y reproducibilidad para número más probable (NMP), para el método se realizará 3 repeticiones, y las respectivas siembras de cada dilución se realizarán por duplicado. Las condiciones de evaluación serán:

- Evaluación de la repetibilidad:

- En el mismo tiempo, las mismas condiciones, entiéndase iguales medios de cultivo, iguales implementos y equipos e igual analista.
- Evaluación de Reproducibilidad:
  - A diferentes tiempos, bajo las mismas condiciones y el mismo analista.
  - En el mismo tiempo, las mismas condiciones y diferentes analistas.

## 5.2. Verificación de los métodos

### 5.2.1. Análisis de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva en muestras de leche.

#### 5.2.1.1 Método de enumeración

El método está basado en las siguientes etapas:

- Inoculación de un medio de cultivo líquido selectivo con diluciones decimales sucesivas del producto.
- Incubación de los tubos inoculados a 37°C en anaerobiosis\* durante 24 h y 48 h. La presencia de estafilococos coagulasa positiva presuntivos es indicada por la reducción del telurito de potasio.

\*En este procedimiento se logra la anaerobiosis mediante la formación de un tapón de agar o parafina o jarra en condiciones de anaerobiosis.

- Inoculación por superficie del medio de cultivo agar Baird Parker a partir de los tubos positivos presuntivos incubados durante 24 h y el resto de los tubos de 48 h.
- Incubación de las placas a 37°C durante 24 h y 48 h. La presencia de estafilococos coagulasa positiva presuntivos es indicada por la reducción del telurito de potasio y la reacción de la yema de huevo.
- Confirmación de las colonias típicas y atípicas por la prueba de la coagulasa.

#### 5.2.1.2. Medios de cultivo, soluciones, reactivos para propiedades bioquímicas y equipos.

- Agua peptona bufferada (BPW)
- Solución salina peptonada (SFP)

- Solución agar
- Agar Baird Parker
- Agar fibrinógeno plasma de conejo
- Solución de telurito de potasio al 1%
- Solución de yema de huevo (aproximadamente al 20% o de acuerdo a instrucciones del fabricante)
- Caldo cerebro, corazón infusión (caldo BHI)
- Plasma de conejo
- Autoclave
- Estufa de incubación 37°C +/- 1°C
- Baño maría o aparato similar capaz de mantener la temperatura a 44°C, 47°C y 37°C
- pHmetro de exactitud 0.01 a 25°C +/- 1°C
- Pipetas de 1ml de capacidad graduadas en intervalos de 0.1ml
- Anclas de platino-iridio o níquel-cromo de aprox. 3 mm de diámetro y anclas de punción del mismo material, o equivalentes estériles descartables.
- Tubos de ensayo, botellas o frascos de capacidad apropiada, en particular de 16 mm x 160 mm y tubos de hemólisis.
- Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro.
- Espátula para cortar el agar
- Jarra de anaerobiosis

### 5.3 Procedimiento

#### 5.3.1. Dilución y homogeneización de la muestra

- La muestra se agita manualmente antes de iniciar la prueba
- Se verifica que el recipiente en el que lleguen la muestras se encuentren limpios y en buenas condiciones antes de abrirlo, para luego abrirlo de forma aséptica.
- Cada muestra de leche se pasará 100 ml a un frasco tapa azul estéril, se agita manualmente y se dejará reposar por 1 minuto (Obteniendo así la dilución  $10^{-1}$ ). Procurando que la temperatura del diluyente y la ambiental sean similares.
- Se transfiere con una pipeta de 1 ml de la suspensión inicial de muestra de leche en un tubo con 9 ml de agua peptonada y telurito de potasio (obteniendo así la dilución  $10^{-2}$ ) y someter a agitador mecánico durante 5 segundos para homogeneizar adecuadamente. Y hacer suspensiones en base 10 hasta lograr  $10^{-6}$ , haciendo por duplicado cada dilución.

- Luego para cada dilución se forma cuidadosamente el tapón de parafina. Después de 24h-48h de incubación a 37°C se observa si hay precipitado oscuro en el tubo, siendo este presuntivo para *S. aureus*.

### 5.3.2. Recuento en placa en superficie de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

- Se remueve cuidadosamente la parafina de cada tubo, se toma 0.1ml de cada dilución y se agrega en la superficie de la caja petri con agar Baird Parker, este procedimiento se realizará por triplicado.
- Se extiende la muestra con un asa estéril sobre el agar
- Se tapan las cajas y se deja absorber la muestra durante unos 15 minutos a temperatura ambiente
- Se invierten las cajas y se llevan a incubar a 37°C ± 2°C durante 18 - 24 h.
- Después de 24 h ± 2 h de incubación, se marcan en las cajas las colonias características típicas (de 1 a 1.5mm de diámetro, negras o grises, brillantes y convexas, redondas de una zona clara) y atípicas.

#### 5.3.2.1. Confirmación: prueba de la coagulasa

De la superficie de cada colonia seleccionada remover un inóculo con asa aguja y transferir a un tubo con caldo cerebro, corazón infusión (caldo BHI), incuba a 37°C ± 2 durante 24 h ± 2. Asépticamente agregar 0.1 ml de cada cultivo en 0.3 ml de plasma de conejo (al menos que otra cantidad sea especificada por el fabricante) en un tubo de hemólisis estéril. Incubar a 37°C ± 1°C. Inclinando el tubo observar la formación de coagulo después de 4 h a 6 h de incubación. Si la prueba es negativa reexaminar después de 24 h de incubación. Considerar un resultado positivo si el cultivo produce al menos una reacción +3 de acuerdo al puntaje de la figura 2, las reacciones de +1 a +2 son consideradas como intermedias. Como control negativo para cada lote de plasma agregar 0.1 ml de caldo BHI estéril a 0.3 ml de plasma de conejo e incubar sin inoculación. Para que la prueba sea válida el control negativo no debe mostrar signos de coagulación. Registrar como positivo cada tubo desde el cual al menos una colonia es confirmada con la prueba de coagulasa positiva.

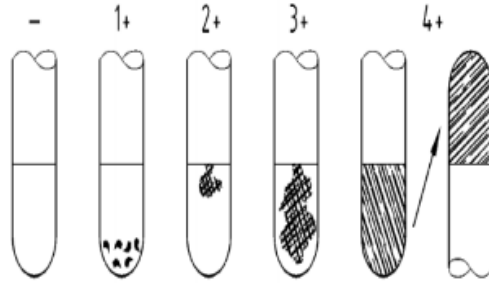


Fig. 2. Puntaje de la prueba de la coagulasa

Negativo (-): no hay evidencia de formación de coágulo

Positivo +1: coágulos pequeños y desorganizados

Positivo +2: un coágulo pequeño organizado

Positivo +3: un coágulo grande organizado

Positivo +4: La totalidad del contenido coagula y el coágulo no se desplaza cuando el tubo es invertido.

#### 5.4. Expresión de resultados

##### 5.4.1 Método de enumeración

##### 5.4.1.1 Selección de las diluciones

Para cada dilución inoculada en el medio líquido, se registra el número de tubos positivos en los cuales se confirma la presencia de *Staphylococcus coagulasa* positiva.

##### 5.4.1.2. Selección de resultados positivos para el cálculo de número más probable (NMP).

Hay combinaciones de tubos positivos con una probabilidad de aparición mucho mayor que otras. La categoría 1 corresponde a los resultados de probabilidad más alta, mientras que los resultados de la categoría 3 son raros y no son fáciles de reproducir. Los peores casos son los resultados de la categoría 0, deberían considerarse con un alto grado de desconfianza. Asumiendo que los resultados del análisis son correctos, debería esperarse que el 95% de las combinaciones correspondan a la categoría 1, el 4 % a la categoría 2 y el 0.9% a la categoría 3 y solamente el 0.1% a la categoría 0. En la tabla 1 del Anexo se explican con más detalles las categorías.

Por consiguiente, se aplican las reglas siguientes:

- Se selecciona la combinación de tres diluciones consecutivas con un perfil de categoría 1 para obtener el índice de NMP. Si se obtiene más de una combinación



con perfil de categoría 1, se utiliza la que tenga un mayor número de tubos positivos.

- Si no se encuentra ninguna combinación de categoría 1, se utiliza la que presente un perfil de categoría 2. Si se obtiene más de una categoría con perfil de categoría 2, se utiliza la que tenga un mayor número de tubos positivos.
- Si no se encuentra ninguna combinación de categoría 2, se utiliza la que presente un perfil de categoría 3. Si se obtiene más de una categoría con perfil de categoría 3, se utiliza la que tenga un mayor número de tubos positivos.

## 5.5. Cálculo y expresión de resultados

### 5.5.1. Número más probable (NMP) de *Staphylococcus aureus*

Seleccionar tres diluciones consecutivas de acuerdo a las diluciones de la muestra y determinar el NMP entrando en la tabla 1 del ANEXO 1. Utilizando el índice de NMP determinado en la tabla 1, se determina la cantidad más probable de microorganismos en el volumen de referencia. El resultado se expresa cómo el número más probable de Estafilococos coagulasa positiva por gramo o mililitro.

## 6. CONCLUSIONES

- Se realizó la respectiva revisión bibliográfica de la técnica de número más probable (NMP) para *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva basada en la ISO 6888-3 de 2004 para valorar los parámetros de reproducibilidad y repetibilidad del método.
- De la respectiva revisión, es importante para los laboratorios de análisis microbiológicos el desarrollar técnicas que originen confiabilidad de los resultados, lo cual se llevaría a cabo a través de la validación del método, permitiría así conseguir exponer resultados puntuales, lo que proporcionaría al laboratorio lograr estándares de calidad alto.
- Referente a la normativa ISO 6888 - 3 (2004) se pudo orientar la metodología del proyecto ya que sus datos son específicos y confiables logrando enfocar los pasos adecuados para una correcta validación.
- Partiendo de la revisión bibliográfica consultada, es importante determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva en la leche cruda debido a las condiciones ambientales en las que crece el microorganismo se puede determinar la presencia de microorganismos patógenos que puedan afectar la inocuidad y la calidad de la leche, afectando tanto al consumidor como a la industria lechera.
- La continuidad del proyecto en laboratorio permitiría las condiciones del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Libre, y así con la validación poder estandarizar los parámetros de la técnica de número más probable (NMP) para *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva.

## 7. ANEXOS

**Tabla 1.** Índice de NMP y límites de confianza (95%) cuando se utilizan tres porciones analíticas de 1ml, tres de 0.1ml y 0.01ml (41).

Número de resultados positivos			Índice de NMP	Categorías (b)	Límites de intervalo de confianza (95%)	
					Límite inferior	Límite superior
0	0	0	<0.20		0.00	0.94
0	0	1	0.30	3	0.01	0.95
0	1	0	0.30	2	0.01	1
0	1	1	0.61	0	0.12	1.7
0	2	0	0.62	3	0.12	1.7
0	3	0	0.94	0	0.35	3.5
1	0	0	0.36	1	0.02	1.7
1	0	1	0.72	2	0.12	1.7
1	0	2	1.1	0	0.4	3.5
1	1	0	0.74	1	0.13	2
1	1	1	1.1	3	0.4	3.5
1	2	0	1.1	2	0.4	3.5
1	2	1	1.5	3	0.5	3.8
1	3	0	1.6	3	0.5	3.8
2	0	0	0.92	1	0.15	3.5
2	0	1	1.4	2	0.4	3.5
2	0	2	2.0	0	0.5	3.8
2	1	0	1.5	1	0.4	3.8
2	1	1	2.0	2	0.5	3.8
2	1	2	2.7	0	0.9	9.4
2	2	0	2.1	1	0.3	4
2	2	1	2.8	3	0.9	9.4
2	2	2	3.5	0	0.9	9.4
2	3	0	2.9	3	0.9	9.4
2	3	1	3.6	0	0.9	9.4
3	0	0	2.3	1	0.5	9.4
3	0	1	3.8	1	0.9	10.4
3	0	2	6.4	3	1.6	18.1
3	1	0	4.3	1	0.9	18.1
3	1	1	7.5	1	1.7	19.9

3	1	2	12	3	3	36
3	1	3	16	0	3	38
3	2	0	9.3	1	1.8	36
3	2	1	15	1	3	38
3	2	2	21	2	3	40
3	2	3	29	3	9	99
3	3	0	24	1	4	99
3	3	1	46	1	9	198
3	3	2	110	1	20	400
3	3	3	>110			

(b) ver tabla 2

**Tabla 2.**

Categoría (a)	Definición
1	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen mayor probabilidad de obtenerse. Como mucho, hay un 5 % de probabilidad de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad de esta categoría
2	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen una probabilidad de obtenerse menor que incluso el resultado menos probable de la categoría 1, pero hay en el mejor de los casos solamente un 1% de probabilidad de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad de esta categoría.
3	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen una probabilidad de obtenerse menor que incluso el resultado menos probable de la categoría 2, pero hay en el mejor de los casos solamente un 0.1% de probabilidad de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad de esta categoría.
0	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen una probabilidad de obtenerse menor que incluso el resultado menos probable de la categoría 3. Solamente hay un 0.1% de probabilidad de obtener un resultado de esta categoría, incluso sin que se haya cometido ninguna incorrección.
(a). Antes de comenzar los análisis, debería decidirse que categoría se va a aceptar, es decir, solamente la categoría 1, la 1 y la 2 o incluso la 1, la 2 y la 3. Cuando se vaya a	

tomar una decisión de gran importancia en base a los resultados, solamente debería aceptarse la categoría 1, o en todo caso la 1 y la 2. Los resultados de la categoría 0 deberían considerarse con un alto grado de desconfianza.

## 8. REFERENCIAS

1. Olivero Rafael; Aguas Yelitza; Cury Katia. Comercialización de leche cruda en Sincelejo, Sucre, Colombia. Rev Colomb cienc Anima [Internet]. 2011;3(1):157–63. Available from: [dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3691435.pdf](http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3691435.pdf)
2. Dávila Fernández N, Hernández García JE. Métodos de ensayos rápidos de detección de microorganismos en la leche. Rev Electrónica Vet REDVET [Internet]. 2006;VII(7):1–18. Available from: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070706.html>
3. Espinosa YN, Rodríguez Y V. Estudio bacteriológico de leche cruda por el sistema Diralec en un municipio de la región oriental del país. REDVET Rev Electrónica Vet Málaga- España [Internet]. 2008;9(7):1–7. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63617061005>
4. WingChing Jonez R, Mora Chaves E. Composición de la leche entera cruda de bovinos antes y después del filtrado. Agron Mesoamericana, Costa Rica [Internet]. 2013;24(1):203–7. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43726204019>
5. Páez L, López N, Salas K, Spaldilero A, Verde O. Características físico-químicas de la leche cruda en las zonas de Aroa y Yaracal, Venezuela. Científica, México [Internet]. 2002;12(2). Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61412208>
6. Calderón A, García F, Martínez G. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. Rev MVZ Córdoba [Internet]. 2006;11(1):725–37. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682006000100006&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682006000100006&script=sci_arttext&tlng=es)
7. Álvarez-Fuentes G, Herrera-Haro J, Alonso-Bastida G, Barreras-Serrano A. Calidad de la leche cruda en unidades de producción familiar del sur de Ciudad de México. Arch Med Vet [Internet]. 2012;44:237–42. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173024970005>
8. Franco G, González V, Gómez M, Carrillo G, Ramírez C. Virulence factors analysis of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in México. Rev Digit Científica y Tecnológica, e-Gnosis [Internet]. 2008;6:1–9. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73011197007>
9. Ruiz AK, Ponce P, Gomes G, Mota RA, Sampaio E, Lucena ER, et al. Prevalencia de Mastitis Bovina Subclínica y Microorganismos Asociados: Comparación entre Ordeño Manual y Mecánico, en Pernambuco, Brasil. Rev Salud Anim [Internet]. 2011;33(1):57–64. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v33n1/rsa09111.pdf>

10. Juan F. Vásquez, Erica T. Loaiza, Martha Olivera. Calidad higiénica y sanitaria de leche cruda acopiada en diferentes regiones colombianas. *ORINOQUIA - Univ los Llanos - Villavicencio, Meta Colomb* [Internet]. 2012;16(2):13–23. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v16n2/v16n2a02>
11. Moreno FC, Mancera VM, Ávila LE, Vargas MR. Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (departamento de Boyacá). *Rev Med Vet (Bogota)* [Internet]. 2007;14:61–83. Available from: <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/1802>
12. Camussone CM, Calvino LF. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2013;45(2):119–30. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v45n2/v45n2a11.pdf>
13. Russi NB, Bantar C, Calvino LF. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in Argentine dairy herds. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2008;40(2):116–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18705495>
14. Socorro Zendejas-Manzo G, Avalos-Flores H, Yadira Soto-Padilla M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. (Spanish). *Gen Microbiol Staphylococcus aureus Charact methods identifying Pathog* [Internet]. 2014;25(3):129–43. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=100189971&lang=es&site=ehost-live>
15. Tamayo EAR, Quiceno JNJ. Factores relacionados con la colonización por *Staphylococcus aureus*. *Iatreia* [Internet]. 2014;28(1):Pág. 66–77. Available from: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/18007>
16. López M. JE, Ochoa Z. A, Santoyo P. G, Anaya L. JL, Medina M. E, Martínez T. M, et al. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: Una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2008;39(3):49–57.
17. Calderón A, García F, Martínez G. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Rev MVZ Córdoba* [Internet]. 2006;11(1):725–37. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69311106>
18. Alonso Nore LX, Poveda Sánchez JA. Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm para el análisis de alimentos [Internet]. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá- Colombia; 2008. Available from: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>

19. Guillén-López S, Vela-Amieva M. Desventajas de la introducción de la leche de vaca en el primer año de vida. *Acta Pediatr Mex* [Internet]. 2010;31(3):123–8. Available from: <http://www.revistasmedicasmexicanas.com.mx/download/actapediatrica/mayo-junio2010/Acta.3.8.DESVENTAJAS.pdf>
20. Becerra Andrade RJ, Pulido Medellín MO, Porras Vargas JL. Efecto del amamantamiento restringido y la crianza artificial sobre la concentración de grasa en la leche de vacas Holstein cruzadas *Revista. Rev Científica, Venez* [Internet]. 2011;11(2):156–61. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95918097009>
21. Hurtado MP, de la Parte MA, Brito A. *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Rev Soc Ven Microbiol Caracas, Venez* [Internet]. 2002;22(2). Available from: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s1315-25562002000200003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s1315-25562002000200003&script=sci_arttext)
22. Akindolire MA, Kumar A, Ateba CN. Genetic characterization of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* from milk in the North-West Province, South Africa. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. King Saud University; 2015; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319562X15002521>
23. Cuartas MC, Molina OL, Restrepo AC, Marín GP, Donado JH, Zuleta JJ, et al. Identificación rápida de *Staphylococcus aureus* en hemocultivos por medio de la prueba directa de la coagulasa. *Iatreia, Univ Antioquia* [Internet]. 2009;22(1):5–10. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180513868001>
24. Victorio De los Santos L, Zorrilla Rodríguez H, Villalobos Mina JM, Estrada González R, Rodríguez Feliciano M. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivo aisladas de cultivo de exudado faríngeo de alumnos del COBACH plantel 29 de Unión Juárez, Chiapas, México. *Bioquímica, México* [Internet]. 2007;32:99. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57609833>
25. Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos. Evaluación de riesgos de *staphylococcus aureus* enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. 2010. 1-74 p.
26. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2000;13(1):16–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88931/pdf/cm000016.pdf>
27. Cervantes-garcía E, García-gonzález R, Salazar-schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* [Internet]. 2014;61(1):28–40. Available from: [www.medigraphic.com/patologiaclinica](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica)



28. Chacón Garza LE, Villarreal Sánchez JA, Villarreal López JL. Comparación de dos modos de número más probable (NMP) con la cuenta viable en placa (CVP) y evaluación de la calidad del agua de la ciudad de Saltillo, Coahuila. [Internet]. 2012. Available from: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico13/034.pdf>
29. Ben-David A, Davidson CE. Estimation method for serial dilution experiments. *J Microbiol Methods* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;107:214–21. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701214002577>
30. Sutton S. The Most Probable Number Method and Its Uses in Enumeration, Qualification, and Validation. *J Valid Technol*. 2010;16(3):35–8.
31. Gobierno de Chile Sección Microbiología de Alimentos. Procedimiento técnica NMP Staphylococcus aureus en alimentos. BAM online 2001 [Internet]. 2001. Available from: [http://www.ispch.cl/lab\\_amb/doc/microbiologia\\_alimentos/PRT-025.pdf](http://www.ispch.cl/lab_amb/doc/microbiologia_alimentos/PRT-025.pdf)
32. Berna JB, Rodríguez CJ. Guía para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo de aguas. :1–96.
33. Soler León JP. Validación Secundaria Del Método De Número Más Probable Y Recuento En Placa Profunda Para Coliformes Totales Y Fecales En Muestras De Alimentos Basada En La Norma ISO NTC 17025 [Internet]. Pontificia Universidad Javeriana; 2006. Available from: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis273.pdf>
34. Meylín L, González O, Claudio D, Martínez R. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas . Métodos cualitativos Validation of alternative methods for microbiological analysis of foods and water . Qualitative methods. 2010;48(2):162–76.
35. Dirección Redes en Salud Pública. Lineamiento Técnico para la Estandarización y Validación de Métodos de Ensayo [Internet]. Bogotá- Colombia; 2014. Available from: [http://www.saludcapital.gov.co/CTDLab/Publicaciones/Lineamiento montaje estandarizacion y validacion.pdf](http://www.saludcapital.gov.co/CTDLab/Publicaciones/Lineamiento_montaje_estandarizacion_y_validacion.pdf)
36. Instituto de Salud de Chile. Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición [Internet]. Chile; 2010. Available from: [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento\\_tecnico/2010/12/Guia T%C3%A9cnica 1 validaci%C3%B3n de M%C3%A9todos y determinaci%C3%B3n de la incertidumbre de la medici%C3%B3n\\_1.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia_T%C3%A9cnica_1_validaci%C3%B3n_de_M%C3%A9todos_y_determinaci%C3%B3n_de_la_incertidumbre_de_la_medici%C3%B3n_1.pdf)
37. Padilla González JE. 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 [Internet]. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá-

- Colombia; 2007. Available from:  
<http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis15.pdf>
38. Camaró-sala ML, Martínez-garcía R, Olmos-martínez P, Catalá-cuenca V, Dolores M, Gimeno-cardona C. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2015;33(7):31–6. Available from:  
[http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pident\\_articulo=90435510&pident\\_usuario=0&pcontactid=&pident\\_revista=28&ty=108&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=28v33n07a90435510pdf001.pdf](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=90435510&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=28&ty=108&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=28v33n07a90435510pdf001.pdf)
39. Eurachem. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temáticas Relacionadas [Internet]. Segunda Ed. Pedrero Izquierdo ME, editor. Centro Nacional de Metrología. México, Los Cués; 2005. 1-67 p. Available from:  
[http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/119370/mod\\_resource/content/1/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf](http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/119370/mod_resource/content/1/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf)
40. Oficina de Acreditación Guatemala C. Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo [Internet]. 2007. Available from:  
<http://oga.org.gt/images/files/File/OGA-GEC-016.pdf>
41. anmat, Administración Nacional de Medicamentos A y TM. Análisis Microbiología de los Alimentos; Metodología Analítica Oficial: Microorganismos Patógenos. [Internet]. ReNaLOA, Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos. 2013. Available from:  
[http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_vol\\_ii.pdf](http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_ii.pdf)
42. Jaramillo Londoño AR, Areiza Segura AM. Análisis del Mercado de la Leche y Derivados Lácteos en Colombia (2008 – 2012) [Internet]. Superintendencia de Industria y Comercio, Colombia. 2012. Available from:  
[http://www.sic.gov.co/drupal/recursos\\_user/documentos/promocion\\_competencia/Estudios\\_Economicos/Estudios\\_Economicos/Estudio\\_Sectorial\\_Leche1.pdf](http://www.sic.gov.co/drupal/recursos_user/documentos/promocion_competencia/Estudios_Economicos/Estudios_Economicos/Estudio_Sectorial_Leche1.pdf)
43. Posada Arias S, Loaiza E, Restrepo JE, Olivera M. Caracterización del ordeño manual e identificación de puntos críticos de control para la calidad higiénica de la leche en una finca del norte de Antioquia. *Rev Lasallista Investig* [Internet]. 2010;7(2):35–46. Available from:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69519014006>
44. Ramón Estévez JN, Restrepo Botero JE, Ruiz Cortés ZT, Olivera Angel M. Detección de riesgos de contaminación con microbios ambientales en un sistema de ordeño mecánico de un hato lechero del norte de Antioquia. *Rev Lasallista Investig* [Internet]. 2011;8(1):7–15. Available from:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69522600002>