

**Verificación del método para la enumeración  
y confirmación de *Staphylococcus aureus* en  
Petrifilm™, en el Laboratorio de  
Microbiología de Alimentos de Zamorano**

**Darvin Abel Cuellar Milián**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Honduras**  
Noviembre, 2015

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Verificación del método para la enumeración  
y confirmación de *Staphylococcus aureus* en  
Petrifilm™, en el Laboratorio de  
Microbiología de Alimentos de Zamorano**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Darvin Abel Cuellar Milián**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2015

# **Verificación del método para la enumeración y confirmación de *Staphylococcus aureus* en Petrifilm™, en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano**

Presentado por:

Darvin Abel Cuellar Milián

Aprobado:

---

Mayra Márquez, Ph.D.  
Asesor Principal

---

Luis Fernando Osorio, Ph.D.  
Director  
Departamento de Agroindustria  
Alimentaria

---

Luis Fernando Osorio, Ph.D.  
Asesor

---

Raúl H. Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

# **Verificación del método para la enumeración y confirmación de *Staphylococcus aureus* en Petrifilm™, en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano**

**Darvin Abel Cuellar Milián**

**Resumen:** Las verificaciones de métodos microbiológicos tienen como propósito proveer evidencia de la exactitud y confiabilidad que tienen los laboratorios para realizar dichos análisis. Como parte del sistema de acreditación basado en la norma ISO 17025:2005 implementado por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LAMZ), se busca verificar el método AOAC 2003.08 para el recuento y confirmación de *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria es la principal especie causante de intoxicaciones estafilocócicas por el consumo de alimentos contaminados. Por esta razón es necesario contar en el LAMZ con un método verificado para el análisis de este microorganismo. Para la verificación de este método se trabajó con tres alimentos; salchicha, vegetales cocidos y leche. Las muestras fueron inoculadas con *S. aureus* a 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> UFC/g. Con los resultados se calcularon los parámetros de desempeño precisión, veracidad e incertidumbre. Los resultados mostraron precisión cumpliendo en un 100% con los criterios de reproducibilidad y repetibilidad, con valor *r* promedio de 0.223 log<sub>10</sub> UFC/g o ml y desviación estándar relativa (RSDr) <10% en todas las muestras. La incertidumbre expandida promedio estimada para el método en estudio fue de 4.3%. La mayor fuente de incertidumbre estuvo asociada a la aplicación de la técnica de análisis, aportando en promedio un 97.83% de la incertidumbre expandida. Los parámetros calculados garantizan que el personal del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano tiene la capacidad de realizar este análisis microbiológico en diferentes alimentos de forma precisa y con resultados válidos.

**Palabras clave:** Acreditación, incertidumbre, precisión, veracidad.

**Abstract:** The aim of the microbiological methods verification is to provide evidence of the precision and reliability that microbiology laboratories have to perform these analysis; as part of the accreditation system based on ISO 17025:2005 implemented by the Zamorano's Food Microbiology Lab; which seeks to verify the method AOAC 2003:08, for the count and confirmation of *Staphylococcus aureus*. This bacteria is the main cause of the foodborne staphylococci intoxications. For this reason, it is necessary that the Zamorano's Lab has a verified method for the analysis of this microorganism. In the verification, it was worked with three kind of foods: sausage, cooked veggies and milk. The samples were inoculated with *S. aureus* at 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> and 10<sup>6</sup> CFU/g. The performance parameters were calculated; precision, trueness and uncertainty. The results shown precision by fully complying with the reproducibility and repeatability; with an *r* value of 0.223 log<sub>10</sub> CFU/g or ml, and less of 10% relative standard deviation (RSDr) for all the samples. The expanded uncertainty estimated for this method was 4.3%. The greater source of uncertainty was related with the method of application, with an average input of 97.83%. The calculated parameters ensure that the Zamorano's Food Microbiology Lab staff is able to apply this microbiological method for different kind of food, with precision and providing valid results.

**Key words:** Accreditation, precision, trueness, uncertainty.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	iv
Índice de Cuadros y Anexos.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>4</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>17</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>18</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>19</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>23</b>

## ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Resultados del análisis de regresión en terminos del ajuste del modelo ( $R^2$ ) para el recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> recuperado y la cantidad inoculada, por analista.....	8
2. Reproducibilidad del recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> ( $\log_{10}$ UFC/g o ml), en los alimentos; vegetales mixtos, salchicha y leche semidescremada (2% de grasa). .....	9
3. Repetibilidad del recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en vegetales mixtos, por nivel de inóculo y analista. ....	11
4. Repetibilidad del recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en salchicha, por nivel de inóculo y analista. ....	12
5. Repetibilidad del recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en leche semidescremada (2% de grasa), por nivel de inóculo y analista.....	12
6. Veracidad del recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> , según matriz alimenticia y nivel de inóculo. ....	13
7. Distribución de la Incertidumbre combinada del método 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count para el recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	14
Anexos	Página
1. Registro de preparación de los medios de cultivo utilizados. ....	23
2. Lista del equipo utilizado para la verificación. ....	23
3. Analistas que participaron en la verificación. ....	23
4. Estimación de la incertidumbre para el método de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
5. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en vegetales mixtos inoculados con 6 $\log_{10}$ UFC/g. ....	28
6. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en vegetales mixtos inoculados con 5 $\log_{10}$ UFC/g. ....	29
7. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en vegetales mixtos inoculados con 4 $\log_{10}$ UFC/g.....	30
8. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en vegetales mixtos inoculados con 3 $\log_{10}$ UFC/g. ....	31
9. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en vegetales mixtos inoculados con 2 $\log_{10}$ UFC/g.....	32

10. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en salchicha inoculada con 6 log <sub>10</sub> UFC/g.....	33
11. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en salchicha inoculada con 5 log <sub>10</sub> UFC/g.....	34
12. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en salchicha inoculada con 4 log <sub>10</sub> UFC/g.....	35
13. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en salchicha inoculada con 3 log <sub>10</sub> UFC/g.....	36
14. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en salchicha inoculada con 3 log <sub>10</sub> UFC/g.....	37
15. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en salchicha inoculada con 2 log <sub>10</sub> UFC/g.....	38
16. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en leche semidescremada (2% de grasa) inoculada con 6 log <sub>10</sub> UFC/ml. ...	39
17. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en leche semidescremada (2% de grasa) inoculada con 5 log <sub>10</sub> UFC/ml. ...	40
18. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en leche semidescremada (2% de grasa) inoculada con 4 log <sub>10</sub> UFC/ml. ...	41
19. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en leche semidescremada (2% de grasa) inoculada con 3 log <sub>10</sub> UFC/ml. ...	42
20. Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en leche semidescremada (2% de grasa) inoculada con 2 log <sub>10</sub> UFC/ml. ...	43

## 1. INTRODUCCIÓN

La verificación de análisis microbiológicos tiene como objetivo proveer evidencia de la exactitud y confiabilidad de los métodos de análisis realizados por el laboratorio, mediante parámetros específicos. Como parte del Sistema de Gestión de Calidad implementado en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ) basado en la norma ISO 17025:2005, se busca verificar el método oficial AOAC 2003.08 de recuento y confirmación de *Staphylococcus aureus* en Petrifilm™. La norma 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/IEC 17025:2005).

Los análisis microbiológicos son una herramienta de gran importancia para la salud pública, tecnología de alimentos y medio ambiente; ya que los resultados tienen una gran repercusión en el diagnóstico, toma de decisiones y control. La verificación de métodos analíticos ha cobrado gran importancia debido al desarrollo de nuevas técnicas y equipos cada vez más complejos, y el interés de garantizar la calidad de los protocolos y resultados. La verificación se define como en conjunto de procesos desarrollados para asegurar el cumplimiento de los requisitos para el uso específico de métodos analíticos mediante el examen y aporte de evidencia objetiva (Camaró *et al.* 2014).

En la industria alimentaria los análisis microbiológicos son usados y requeridos en inspecciones gubernamentales para asegurar el cumplimiento de requerimientos legales en los alimentos; para determinar el cumplimiento de los estándares microbiológicos en el comercio internacional; en el control de la calidad y procesos en la industria de alimentos; en laboratorios educativos para investigación; en laboratorios de referencia para validar los resultados de otros laboratorios. Los resultados en estos análisis deben de ser exactos, por esta razón es necesario determinar las características de desempeño de cada método analítico empleado, y que todos los involucrados estén de acuerdo con él (Mead 2007). Existen varios métodos estandarizados disponibles desarrollados por agencias internacionales, entre ellas: International Organization for Standardization (ISO), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Standard Methods for the Examination of Dairy Products, American Society for Testing and Material (ASTM), Environmental Protection Agency (EPA), Association of Analytical Communities (AOAC), y Food and Drug Administration (FDA) (Parraga y Pilla, 2013).

Para el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano, es fundamental tener un método verificado para el recuento y confirmación de *Staphylococcus aureus* debido a la importancia de esta bacteria en la inocuidad de los alimentos. *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva, no móvil, de forma esférica, vista bajo el microscopio como un arreglo similar al de racimos de uvas. Esta bacteria es ubicua, por lo que se encuentra difundida en el ambiente y es prácticamente imposible erradicarla (FDA 2012).

*S. aureus* es la principal especie causante de intoxicaciones estafilocócicas causadas por el consumo de alimentos contaminados (Portocarrero *et al.* 2002). En algunos países es considerado el segundo microorganismo causante de intoxicaciones por alimentos (Atanassova *et al.* 2001). Los principales síntomas de una intoxicación estafilocócica son náuseas, vómito violento, calambres estomacales y diarrea, presentándose de una a ocho horas después de haber consumido el alimento. El diagnóstico de la intoxicación es confirmado al encontrar  $> 10^5$  UFC/g de *S. aureus* en remanentes del alimento causante de la intoxicación, mediante la detección de enterotoxina estafilocócica en el alimento o al aislar el mismo fagotipo del paciente enfermo y el alimento. Sin embargo el diagnóstico se hace principalmente mediante la detección de enterotoxina en el alimento (Kérouanton *et al.* 2007). *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 (Pelisser *et al.* 2009). Las enterotoxinas estafilocócicas son resistentes a la acción de enzimas proteolíticas gastrointestinales como la pepsina y tripsina, y altamente resistentes al calor (Atanassova *et al.* 2001).

La producción de enterotoxinas estafilocócicas en un alimento está determinada por factores como lo son recuento de células, temperatura, concentración de sal, pH y flora competitiva (Ertas *et al.* 2010). Las condiciones para la producción de enterotoxinas estafilocócicas, se encuentran en un rango de temperatura de 10-46 °C (siendo la temperatura óptima 34-40 °C), una actividad de agua de 0.86 a  $\geq 0.99$ , pH de 5 - 9.6, y una concentración de sal (NaCl) menor a 12%. Se desarrolla bien en ambiente anaeróbico o aeróbico (Schelin *et al.* 2011).

Los métodos estándares y de referencia muchas veces son considerados como laboriosos, tardados y caros (Rentenaar 1996), y que su implementación es poco flexible y muy lenta (Hitchins, 1996, Leclercq *et al.* 2000). En la microbiología moderna existen nuevos métodos para la detección y enumeración de microorganismos en alimentos, esto como resultado del desarrollo de la biotecnología, inmunología e instrumentación. Estos métodos como es el caso del sistema Petrifilm<sup>TM</sup>, tienen una mayor facilidad de uso y son mucho más prácticos. Como parte de las acreditaciones para laboratorios de microbiología, es necesaria la verificación de los métodos microbiológicos utilizados, ya sean métodos estandarizados, métodos estandarizados modificados, o métodos alternativos (Mead 2007). El Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano debe asegurar mediante la verificación, que domina los métodos de ensayo y es capaz de aplicarlos de forma correcta. La Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA), que es la acreditadora del LMAZ, establece que el laboratorio debe de calcular y evaluar los parámetros de desempeño que considere necesarios para asegurar la confiabilidad del método (OGA 2007). Para métodos normalizados se debe de evaluar como mínimo los parámetros de desempeño: precisión (repetibilidad y reproducibilidad), veracidad e incertidumbre (ECA 2014). Por su parte el Organismo Hondureño de Acreditación OHA indica que para la verificación de métodos normalizados se deben considerar como mínimo los parámetros de precisión, veracidad, límite de cuantificación (si aplica) e incertidumbre (si aplica) (OHA 2015).

La precisión es el grado de concordancia entre los resultados (independientes) del ensayo, obtenidos al aplicar el procedimiento de análisis varias veces a la misma muestra. Usualmente se calcula como la desviación estándar de los resultados del ensayo y expresada en términos de imprecisión. Una desviación estándar relativamente alta, indica una baja precisión (Uyttendaele y Debevere, 2007). El parámetro de precisión se

divide en dos partes: la repetibilidad que indica la variabilidad observada dentro de un laboratorio, durante un corto período de tiempo, operando con el mismo analista, los mismos aparatos de laboratorio y materiales idénticos. Mientras que la reproducibilidad indica la variabilidad observada cuando distintos analistas o laboratorios analizan la misma muestra, utilizando el mismo método microbiológico (Uyttendaele y Debevere 2007).

La veracidad es el grado de concordancia entre el valor verdadero y la media de los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento de análisis varias veces. Si se desconoce el valor verdadero, se debe utilizar el valor de referencia aceptado (Uyttendaele y Debevere 2007). La incertidumbre se define como “un parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que puede ser atribuido razonablemente al mensurando” (Ellison *et al.* 2012).

La incertidumbre de medición incluye varios componentes, algunos pueden ser evaluados a partir de la distribución estadística de los resultados y caracterizados mediante desviación estándar. Por su parte otros componentes que también pueden ser caracterizados por desviación estándar, son evaluados usando distribuciones de probabilidades basadas en la experiencia u otra información (Ellison *et al.* 2012). Es importante mencionar que la incertidumbre no significa duda en el análisis microbiológico, la incertidumbre implica una mayor confianza en la validez de los resultados obtenidos usando el método microbiológico. La incertidumbre de los resultados puede tener diferentes fuentes que deben ser consideradas (Niemelä 2002). Las principales fuentes de incertidumbre son: el muestreo, las condiciones de almacenamiento, el efecto de los instrumentos de medición, pureza de los reactivos, condiciones ambientales, muestra (composición de la matriz), efectos de cómputo, analista y efectos aleatorios (Ellison *et al.* 2012).

Los laboratorios de ensayos deben de tener y aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de las mediciones que realiza. En caso de que la naturaleza del método de ensayo no requiera un cálculo riguroso, el laboratorio debe por lo menos de tratar de identificar los componentes de la incertidumbre y hacer una estimación razonable. Debe también asegurarse de reportar los resultados de una forma clara para no dar una idea errónea sobre la incertidumbre. Una estimación aceptable se debe de basar en el conocimiento del desempeño del método y en el alcance de la medición; haciendo uso de la experiencia adquirida y de métodos de verificaciones anteriores (ISO, 2005). Este estudio busca verificar los parámetros de desempeño del método para la enumeración y confirmación de *S. aureus* en placas Petrifilm™ en tres alimentos de diferente tipo. Al igual que determinar la incertidumbre de medición del método y el factor que más aporta a esta.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**Selección de las muestras (matrices alimenticias).** Las muestras fueron seleccionadas aleatoriamente, el estudio se realizó con tres matrices alimenticias elegidas con base en el reglamento técnico centroamericano (RTCA). En el cual se indican las categorías de alimentos para las que se establecen límites de *Staphylococcus aureus* (RTCA 2009).

**Protocolo para la verificación del método estándar.** Para la verificación del método oficial AOAC 2003.08 para recuento y confirmación de *Staphylococcus aureus* en Petrifilm®, se siguió el protocolo para la verificación de métodos microbiológicos cuantitativos ISO 16140 (ISO 2003), que se presenta a continuación.

**Matrices alimenticias:** salchicha (producto cárnico cocido), leche (2% de grasa) (producto lácteo) y vegetales mixtos cocidos (alimento listo para consumo). Las muestras fueron procesadas por tres analistas. Teniendo en total tres matrices alimenticias × cinco niveles de inóculo × tres repeticiones (analistas). Todas las muestras fueron contadas por cada analista para determinar los parámetros de desempeño.

**Preparación del inóculo.** Para la preparación del inóculo se utilizó un cultivo de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosembach (25923, ATCC) del stock de referencia del LMAZ, los cultivos se encuentran almacenados en tubos Eppendorf con Agar de soya a 4 °C. Con un hisopo estéril se tomó una pequeña cantidad del cultivo y se sembró en 10 ml de caldo soya tripticasa, luego se incubó a 35 °C por 24 horas. El proceso anterior se realizó en una cámara de flujo laminar por razones de bioseguridad e inocuidad.

El cultivo después de ser incubado, fue sembrado en Agar Soya Tripticasa, mediante el método de rayado. El rayado de placa se realizó en forma ordenada, dividiendo en tres secciones el plato Petri, de forma que el crecimiento de las bacterias fuese claro y se pudieran aislar para obtener un cultivo puro. Para el rayado en placa de *S. aureus* se usaron asas esterilizadas. Las placas Petri fueron incubadas a 35 °C por 24 horas. Para la preparación del inóculo se tomó con asas estériles, colonias aisladas típicas de *S. aureus* y se colocaron en tubos con 10 ml de caldo soya tripticasa, los tubos se dejaron incubar a 35 °C durante 24 horas. Luego el cultivo de *Staphylococcus* fue diluido en buffer de fosfatos para obtener los niveles de inóculo con los que se inocularon las muestras:  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/g de muestra.

**Inoculación de muestras con *Staphylococcus aureus*.** En la verificación de este método se utilizaron tres matrices alimenticias. Salchicha, leche semidescremada (2% de grasa) y vegetales mixtos cocidos. Cada una de las matrices se inoculó con los cinco niveles de inóculo de *Staphylococcus aureus*.

Para cada una de las matrices se tomaron 100 gramos de muestra y se inocularon por cada nivel de inóculo, utilizando bolsas estériles. Luego de haber inoculado las muestras, se homogeneizaron durante dos minutos en un homogeneizador peristáltico.

Se pesaron 50 gramos de las muestras inoculadas y se colocaron en una bolsa estéril, luego se agregaron 450 ml de buffer de fosfatos, y se colocaron en el homogeneizador por dos minutos. Una vez listas las muestras inoculadas con cada uno de los niveles de inóculo, se procedió a realizar las diluciones necesarias para sembrar en Petrifilm™, para hacer las diluciones se colocaron 10 ml de la muestra diluida en 90 ml de buffer de fosfatos (AOAC 2005). Una vez listas las diluciones se sembraron en Petrifilm™ Staph Express, siguiendo el método AOAC 2003.08.

**Protocolo para la detección y recuento de *S. aureus*.** La detección y recuento de *S. aureus* se realizó mediante la siembra de diluciones de cada nivel de inóculo, para las tres matrices alimenticias en placas Petrifilm®, siguiendo la metodología AOAC 2003.08, con el conocimiento que esta metodología es adecuada para este tipo de investigación según literatura consultada (Silva *et al.* 2005, Nogueira *et al.* 2010). Las placas de cultivo contienen medio Baird Parker modificado listo para su uso, que es selectivo y diferencial para *S. aureus*. Los discos Petrifilm™ Staph Express son utilizados para identificar colonias sospechosas de ser *S. aureus*; contienen un colorante y ácido desoxirribonucleico que reacciona con la desoxirribonucleasa producida por *S. aureus* produciendo zonas con coloración rosa (AOAC 2005).

Una vez lista la dilución a sembrar, se colocó la placa rehidratable en una superficie plana, se levantó la película superior de la placa y se inoculó 1 ml de la solución preparada, en el centro de la película inferior; con cuidado se bajó la película superior sobre el inóculo. Se distribuyó el inóculo en toda el área de crecimiento (6.2 cm de diámetro) haciendo presión hacia abajo con un esparcidor de plástico. Se dejaron reposando las placas para permitir que el medio de cultivo solidificara de forma correcta. Luego se incubaron a 35 °C por 24 ± 2 h, colocando las placas de forma horizontal en estibas no mayores a 20 unidades.

Luego de haber sido incubadas las placas Petrifilm™ se contaron las colonias de *S. aureus* (colonias de color rojo-violeta). Debido a que no hubo crecimiento de colonias atípicas, no fue necesario el uso de los discos Petrifilm™ de confirmación.

**Muestras control inoculadas.** Se sembraron platos Petri con el mismo nivel de inóculo que las muestras en Petrifilm™. Para ello se inocularon 100 ml de buffer de fosfatos con los cinco niveles de inóculo usados para la verificación. Se hicieron diluciones en buffer de fosfatos y se sembró mediante la técnica de vaciado en placa en medio agar soya tripticasa. Los platos Petri fueron incubados a 35 °C durante 24 ± 2 h.

**Recuento de colonias de *S. aureus* en UFC/ml o g.** Se realizó el conteo de las placas Petrifilm™ y los platos Petri inoculados, se sembraron únicamente las diluciones que estaban en el rango contable 25-250 colonias por plato. Los recuentos se multiplicaron por su factor de dilución para obtener UFC/g o ml. Después estos valores se pasaron a log<sub>10</sub> para tener así el dato de log<sub>10</sub> UFC/g o ml inoculados y recuperados, para cada matriz.

### Modelo estadístico

**Precisión.** Para medir la precisión del método se estimó la reproducibilidad y repetibilidad. La reproducibilidad fue estimada considerando como parámetro de desempeño la precisión entre cada analista al procesar cada matriz alimenticia y nivel de inóculo. Para que exista aceptación en el estudio el valor absoluto de la diferencia de recuentos expresados en log<sub>10</sub> UFC/g o ml, entre analistas debe ser menor o igual al criterio de precisión. Para al menos el 90% de los datos (APHA 1999). Si el valor absoluto de las diferencias entre analistas es mayor al criterio de precisión ( $r$ ) los resultados no cumplen con el parámetro de precisión. El criterio de precisión fue calculado utilizando la ecuación 1 (Wehr 2012).

$$r = 0.028 \times (\bar{X}) \times RSDr \quad [1]$$

Donde:

$r$ : Criterio de precisión.

$\bar{X}$ : Media aritmética.

$RSDr$ : Desviación estándar relativa.

La repetibilidad fue estimada usando como parámetro de aceptación la desviación estándar relativa de los recuentos de cada matriz alimenticia y nivel de inóculo, por cada analista. La repetibilidad del método es confiable cuando la RSD entre analistas es  $\leq 10\%$  en el 90% de los datos (Wehr, 2012). La desviación estándar relativa fue calculada utilizando la ecuación 2.

$$RSDr = (SD/\bar{X}) \times 100 \quad [2]$$

Donde:

$RSDr$ : Desviación estándar relativa.

$\bar{X}$ : Media aritmética.

**Veracidad.** La veracidad se obtuvo al comparar los resultados del recuento de colonias de *S. aureus* de esta verificación con los valores de referencia aceptados. En este estudio con los resultados obtenidos se calculó la desviación estándar relativa (RSD) y se comparó con RSD calculada con los resultados de la validación para este método (AOAC 2003.08) realizada por la AOAC (Silbernagel *et al.* 2003a, 2003b) (McMahon *et al.* 2003). La desviación estándar relativa se calculó con la misma fórmula utilizada en el análisis de precisión.

**Análisis de varianza.** Se realizó un análisis de varianza utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS versión 9.3<sup>®</sup>) para determinar las diferencias estadísticas entre

matrices alimenticias, niveles de inóculo o analistas. También se evaluó la interacción entre matriz alimenticia y nivel de inóculo, y matriz, analista y nivel de inóculo. Con un nivel de confianza del 95%.

**Incertidumbre.** El cálculo de la incertidumbre del conteo se realizó por el método de recuperación de muestras inoculadas sugerido por la American Association for Laboratory Accreditation (AALA, 2014). Para identificar las fuentes de variación que aportan a la incertidumbre se estimó un presupuesto de incertidumbre mediante un diagrama tipo espina de pescado (Corry et al. 2007) (Lombard 2006). Para el cálculo de la incertidumbre los valores de la cantidad de microorganismo inoculada y la cantidad recuperada contada, expresados en UFC/g o ml se transformaron a valores de  $\log_{10}$  UFC/g o ml, para reducir la variación y obtener una distribución normal (APHA 1999). Con los datos de la cantidad de *S. aureus* inoculada y la cantidad recuperada, se calculó el porcentaje recuperado. Restando la cantidad recuperada de la inoculada, y multiplicando el resultado por 100.

Luego se calculó la desviación estándar (SD) del porcentaje de recuperación. La desviación estándar es igual a la incertidumbre asociada a la aplicación de la técnica de análisis. La incertidumbre combinada se calculó sumando la incertidumbre asociada a la técnica de análisis y la incertidumbre aportada por los materiales de diluciones. Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre combinada por el factor de cobertura  $k=2$ , para tener un 95% de confianza (Corry et al. 2007; APHA 1999).

Dado que la cantidad recuperada está expresada en porcentaje (%), al momento de calcular la incertidumbre para una muestra, se debe multiplicar la incertidumbre (%) por el valor del resultado expresado en  $\log_{10}$  UFC/g o ml. Como la incertidumbre es un rango se debe de sumar y restar al resultado en  $\log_{10}$  UFC/g o ml del conteo. Una vez listo el rango de incertidumbre en  $\log_{10}$  UFC/g o ml, se calculará el rango de incertidumbre expresado en  $\log_{10}$  UFC/g o ml (AALA 2014).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó un análisis de regresión con los resultados del porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* el cual mostró que los resultados se ajustan al modelo lineal con un 99% de confiabilidad. Indicando de esta forma que la cantidad de *S. aureus* recuperada es la misma que se está recuperando mediante la aplicación del método de análisis (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados del análisis de regresión en términos del ajuste del modelo ( $R^2$ ) para el recuento de *Staphylococcus aureus* recuperado y la cantidad inoculada, por analista.

<b>Analista</b>	<b>Valor <math>R^2</math></b>
1	0.9921
2	0.9933
3	0.9936

Para determinar la precisión del método se evaluó la repetibilidad y la reproducibilidad. En el análisis de reproducibilidad en todas las matrices alimenticias y niveles de inóculo se cumplió con el criterio de precisión ya que el valor absoluto de la diferencia de los recuentos entre analistas fue menor al criterio de precisión en el 100% de los datos. Estos resultados indican un alto grado de concordancia al realizar el mismo análisis a las mismas muestras por diferentes analistas (Uyttendaele y Debevere, 2007) (Cuadro 2).

Para el cálculo de los criterios de precisión para los niveles de inóculo de los cuales no se encontró información disponible en la literatura consultada, se utilizó la desviación estándar relativa (RSDr) de esta verificación. Para las matrices alimenticias vegetales y leche se utilizó como referencia para calcular la RSDr los resultados de las validaciones realizadas por la AOAC para este método en estudio. Las validaciones realizadas por la AOAC consistieron en un análisis comparativo entre el método Petrifilm™ Staph Express Count y el método oficial de la AOAC 975.55 para la enumeración de *Staphylococcus aureus* en alimentos. Se evaluaron un total de 14 alimentos, con la participación de 13 laboratorios. Los cuales evaluaron ocho muestras de cada tipo de alimento, y tres niveles de inóculo. Determinando que la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) entre ambos métodos es estadísticamente igual (Silbernagel *et al.* 2003a, 2003b) (McMahon *et al.* 2003). En este estudio el 100% de los datos cumplieron con los criterios de precisión. Esto revela que el personal del Laboratorio de Microbiología de Zamorano es capaz de aplicar este método con un alto grado de precisión.

En la validación realizada por De Buyser *et al.* (2003), se evaluaron los métodos estándares para la enumeración de *S. aureus* cuagulasa-positiva en alimentos EN ISO 6888-1 y 2. Teniendo como resultado para el método 6888-1 un valor ( $r$ ) de 0.28 ( $\log_{10}$  UFC/g) y para el método 6888-2 un  $r = 0.22 \log_{10}$  UFC/g, siendo estos valores similares a los obtenidos en este estudio (valor  $r$  promedio =  $0.223 \log_{10}$  UFC/g). Los resultados de reproducibilidad de esta verificación se compararon con valores  $r$  de repetibilidad de otros estudios ya que en ésta la reproducibilidad se calculó únicamente debido al cambio del analista y no fue una ronda de verificación interlaboratorios. El análisis de reproducibilidad realizado en este estudio se fundamentan en que la reproducibilidad puede determinarse con datos producidos por un solo laboratorio (Corry *et al.* 2007). El cumplimiento con el parámetro de reproducibilidad respalda el hecho de que el personal del laboratorio de microbiología de Zamorano es capaz de realizar este análisis microbiológico con precisión sin importar quien de sus analistas realice el mismo.

Cuadro 2. Reproducibilidad del recuento de *Staphylococcus aureus* ( $\log_{10}$  UFC/g o ml), en los alimentos; vegetales mixtos, salchicha y leche semidescremada (2% de grasa).

<b>Matriz</b>	<b>L1<sup>£</sup></b>	<b>L2<sup>µ</sup></b>	<b>L3<sup>º</sup></b>	<b> L1-L2 </b>	<b> L1-L3 </b>	<b> L2-L3 </b>	<b>A/NA<sup>β</sup></b>	<b>CRITERIO PRECISIÓN</b>
Vegetales	5.86	5.86	5.92	0.000	0.060	0.060	A	0.191 <sup>ω</sup>
Vegetales	5.90	5.94	5.96	0.040	0.060	0.020	A	0.191
Vegetales	6.03	6.02	6.03	0.010	0.000	0.010	A	0.191
Vegetales	4.95	4.94	4.99	0.010	0.040	0.050	A	0.093 <sup>ω</sup>
Vegetales	4.91	4.91	4.94	0.000	0.030	0.030	A	0.093
Vegetales	4.90	4.98	4.99	0.080	0.090	0.010	A	0.093
Vegetales	3.98	4.06	4.06	0.080	0.080	0.000	A	0.166 <sup>σ</sup>
Vegetales	3.91	3.96	4.00	0.050	0.090	0.040	A	0.166
Vegetales	3.89	3.96	3.97	0.070	0.080	0.010	A	0.166
Vegetales	2.90	2.92	2.97	0.020	0.070	0.050	A	0.158 <sup>ε</sup>
Vegetales	2.89	2.97	3.00	0.080	0.110	0.030	A	0.158
Vegetales	2.93	3.00	3.03	0.070	0.100	0.030	A	0.158
Vegetales	2.00	2.00	2.00	0.000	0.000	0.000	A	0.131 <sup>ω</sup>
Vegetales	2.00	1.95	1.95	0.050	0.050	0.000	A	0.131
Vegetales	2.00	2.08	2.08	0.080	0.080	0.000	A	0.131
Salchicha	5.69	5.73	5.75	0.040	0.060	0.020	A	0.393
Salchicha	5.05	5.07	5.09	0.020	0.040	0.020	A	0.230 <sup>ω</sup>
Salchicha	5.16	5.16	5.18	0.000	0.020	0.020	A	0.230
Salchicha	5.00	4.94	4.97	0.060	0.030	0.030	A	0.230
Salchicha	4.19	4.20	4.20	0.010	0.010	0.000	A	0.336 <sup>ω</sup>
Salchicha	3.96	4.03	4.04	0.070	0.080	0.010	A	0.336

Continuación Cuadro 2.

Matriz	L1 <sup>£</sup>	L2 <sup>µ</sup>	L3 <sup>ο</sup>	L1-L2	L1-L3	L2-L3	A/NA <sup>β</sup>	CRITERIO PRECISIÓN
Salchicha	3.04	3.04	3.09	0.000	0.050	0.050	A	0.290 <sup>ο</sup>
Salchicha	2.79	2.84	2.86	0.050	0.070	0.020	A	0.290
Salchicha	2.90	2.89	2.90	0.010	0.000	0.010	A	0.290
Salchicha	2.11	2.11	2.11	0.000	0.000	0.000	A	0.385 <sup>ο</sup>
Salchicha	1.85	1.85	1.85	0.000	0.000	0.000	A	0.385
Salchicha	2.11	2.15	2.15	0.040	0.040	0.000	A	0.385
Leche	6.01	6.01	6.06	0.000	0.050	0.050	A	0.136
Leche	5.92	5.94	5.95	0.020	0.030	0.010	A	0.136
Leche	4.86	4.87	4.86	0.010	0.000	0.010	A	0.165 <sup>ο</sup>
Leche	4.96	4.96	4.98	0.000	0.020	0.020	A	0.165
Leche	5.01	4.98	5.01	0.030	0.000	0.030	A	0.165
Leche	3.98	3.96	3.99	0.020	0.010	0.030	A	0.043 <sup>ο</sup>
Leche	3.96	3.95	3.96	0.010	0.000	0.010	A	0.043
Leche	3.94	3.95	3.96	0.010	0.020	0.010	A	0.043
Leche	3.02	2.99	3.01	0.030	0.010	0.020	A	0.297 <sup>ζ</sup>
Leche	2.97	2.95	2.97	0.020	0.000	0.020	A	0.297
Leche	2.98	2.95	2.97	0.030	0.010	0.020	A	0.297
Leche	2.08	2.11	2.11	0.030	0.030	0.000	A	0.327 <sup>δ</sup>
Leche	2.15	2.15	2.15	0.000	0.000	0.000	A	0.327
Leche	1.95	1.95	1.95	0.000	0.000	0.000	A	0.327

<sup>£</sup> log<sub>10</sub> UFC/g o ml del conteo analista 1/ <sup>µ</sup> log<sub>10</sub> UFC/g o ml del conteo analista 2/ <sup>ο</sup> log<sub>10</sub> UFC/g o ml del conteo analista 3.

<sup>β</sup> A: Aceptable / NA: No aceptable.

<sup>ο</sup> Criterio de precisión calculado con los datos de esta verificación para *S. aureus*.

<sup>ζ</sup> Criterio de precisión calculado con los valores de validación de Petrifilm Staph Express Count en vegetales mixtos inoculados con 4 log<sub>10</sub> UFC/g de *S. aureus*, AOAC.

<sup>ε</sup> Criterio de precisión calculado con los valores de validación de Petrifilm Staph Express Count en vegetales mixtos inoculados con 3 log<sub>10</sub> UFC/g de *S. aureus*, AOAC.

<sup>ζ</sup> Criterio de precisión calculado con valores de validación de Petrifilm Staph Express Count en leche cruda inoculada con 3 log<sub>10</sub> UFC/ml de *S. aureus*, AOAC.

<sup>δ</sup> Criterio de precisión calculado con valores de validación de Petrifilm Staph Express Count en leche cruda inoculada con 2 log<sub>10</sub> UFC/ml de *S. aureus*, AOAC.

Se logró determinar que la repetibilidad del método es confiable ya que la desviación estándar relativa de los resultados debe ser ≤10% en el 90% de los datos (Wehr 2012). Y en esta verificación el 100% de los datos presentaron una RSDr menor a 10% (Cuadro tres, cuatro y cinco). El mayor rango de variación en esta verificación se tuvo en el análisis para salchicha, siendo la RSDr de 1.61 a 7.99%. Parraga y Pilla (2013), en la verificación de los métodos para el recuento de bacterias mesófilas aerobias (BMA) y coliformes totales (CT);

reportan valores RSD<sub>r</sub> de 1.13 a 11.39% y 0.19 a 9.67% respectivamente, siendo la variación mayor a la observada en esta verificación. En la validación de métodos estándares para el recuento de *S. aureus* realizada por De Buyser *et al.* (2003), la RSD<sub>r</sub> estuvo en el rango de 3.0 a 8.5 %, que fue similar a los resultados de repetibilidad de esta verificación. El cumplimiento con el parámetro de repetibilidad indica que el personal del laboratorio de microbiología de Zamorano es capaz de realizar este análisis microbiológico con precisión.

Cuadro 3. Repetibilidad del recuento de *Staphylococcus aureus* en vegetales mixtos, por nivel de inóculo y analista.

Nivel de inóculo UFC/g	Analista	log <sub>10</sub> UFC/g		RSD <sub>r</sub> <sup>Ψ</sup> (%)
		Promedio	SD <sup>Φ</sup>	
10 <sup>2</sup>	1	2.000	0.000	0.000
	2	2.010	0.066	3.262
	3	2.010	0.066	3.262
10 <sup>3</sup>	1	2.907	0.021	0.716
	2	2.963	0.040	1.364
	3	3.000	0.030	1.000
10 <sup>4</sup>	1	3.927	0.047	1.204
	2	3.993	0.047	1.180
	3	4.010	0.046	1.143
10 <sup>5</sup>	1	4.920	0.026	0.538
	2	4.943	0.035	0.710
	3	4.973	0.029	0.580
10 <sup>6</sup>	1	5.930	0.089	1.499
	2	5.940	0.080	1.347
	3	5.970	0.056	0.933

<sup>Φ</sup> Desviación estándar (raíz cuadrada de la varianza).

<sup>Ψ</sup> Desviación estándar relativa, desviación estándar dividida para el promedio y multiplicada por cien.

Cuadro 4. Repetibilidad del recuento de *Staphylococcus aureus* en salchicha, por nivel de inóculo y analista.

Nivel de inóculo UFC/g	Analista	log <sub>10</sub> UFC/g		RSD <sub>r</sub> (%)
		Promedio	SD	
10 <sup>2</sup>	1	2.023	0.150	7.419
	2	2.037	0.163	7.998
	3	2.037	0.163	7.998
10 <sup>3</sup>	1	2.910	0.125	4.306
	2	2.923	0.104	3.560
	3	2.950	0.123	4.165
10 <sup>4</sup>	1	4.033	0.136	3.366
	2	4.073	0.112	2.737
	3	4.077	0.110	2.691
10 <sup>5</sup>	1	5.070	0.082	1.614
	2	5.057	0.111	2.187
	3	5.080	0.105	2.074
10 <sup>6</sup>	1	5.877	0.176	2.998
	2	5.920	0.165	2.791
	3	5.940	0.165	2.771

Cuadro 5. Repetibilidad del recuento de *Staphylococcus aureus* en leche semidescremada (2% de grasa), por nivel de inóculo y analista.

Nivel de inóculo UFC/ml	Analista	log <sub>10</sub> UFC/ml		RSD <sub>r</sub> (%)
		Promedio	SD	
10 <sup>2</sup>	1	2.060	0.101	4.927
	2	2.070	0.106	5.113
	3	2.070	0.106	5.113
10 <sup>3</sup>	1	2.990	0.026	0.885
	2	2.963	0.023	0.779
	3	2.983	0.023	0.774
10 <sup>4</sup>	1	3.960	0.020	0.505
	2	3.953	0.006	0.146
	3	3.970	0.017	0.436
10 <sup>5</sup>	1	4.943	0.076	1.545
	2	4.937	0.059	1.187
	3	4.950	0.079	1.603
10 <sup>6</sup>	1	5.987	0.059	0.979
	2	5.990	0.044	0.728
	3	6.020	0.064	1.054

La veracidad del método se estimó comparando la desviación estándar relativa (RSD) de los resultados obtenidos y la RSD calculada con los resultados presentados por la AOAC en la validación de este método. El criterio de desempeño utilizado para las muestras inoculadas con 5 y 6 log<sub>10</sub> UFC/g o ml fue estimado con los datos de esta verificación. Para las muestras inoculadas con dos, tres y cuatro log<sub>10</sub> UFC/g o ml se utilizaron los criterios de desempeño (RSD) de las validaciones para este método (Petrifilm Staph Express Count) realizadas por la AOAC (Silbernagel *et al.* 2003a, 2003b; McMahon *et al.* 2003).

Cuadro 6. Veracidad del recuento de *Staphylococcus aureus*, según matriz alimenticia y nivel de inóculo.

Matriz	Inóculo UFC/g o ml	log <sub>10</sub> UFC/g o ml		RSD (%)	Criterio de Desempeño (RSD) (%)
		Promedio	SD		
Vegetales	10 <sup>2</sup>	2.007	0.047	2.324	2.324
	10 <sup>3</sup>	2.957	0.049	1.657	2.070
	10 <sup>4</sup>	3.977	0.058	1.461	1.590
	10 <sup>5</sup>	4.946	0.035	0.709	0.709
	10 <sup>6</sup>	5.947	0.068	1.150	1.150
Salchicha	10 <sup>2</sup>	2.032	0.138	6.773	6.773
	10 <sup>3</sup>	2.928	0.104	3.536	3.536
	10 <sup>4</sup>	4.061	0.106	2.601	2.601
	10 <sup>5</sup>	5.069	0.087	1.721	1.721
	10 <sup>6</sup>	5.912	0.149	2.517	2.517
Leche	102	2.067	0.091	4.382	4.540
	103	2.979	0.024	0.813	3.000
	104	3.961	0.015	0.388	0.388
	105	4.943	0.063	1.267	1.267
	106	6.000	0.051	0.858	0.858

Los resultados muestran una veracidad satisfactoria para los recuentos de *S. aureus* en las tres matrices y los cinco niveles de inóculo utilizados. Ya que en todos la desviación estándar relativa fue menor o igual al criterio de veracidad establecido (RSD) (Cuadro 6). Parraga y Pilla (2013), evaluaron la veracidad para los métodos de recuento de BMA y CT, con resultados de RSD mayores a los obtenidos en esta verificación, pero de igual forma se cumplió con el parámetro de veracidad en la verificación realizada por las mismas. Con los resultados de veracidad de esta verificación se puede concluir que los resultados obtenidos al aplicar este método por el LMAZ van acorde con los valores de referencia para este método de la AOAC.

Se logró determinar que la mayor fuente de incertidumbre en el desarrollo del método para recuento de *Staphylococcus aureus* AOAC 2003.08, está asociada al efecto de la ejecución de la técnica de análisis. Siendo para todas las muestras, mayor al 90% de la incertidumbre combinada expandida (Cuadro 7). El proceso para el análisis microbiológico incluye varias actividades como son la recolección de muestras, el transporte de las muestras al laboratorio, la preparación de submuestras, la inoculación de las muestras, la preparación de diluciones y siembra en medios de cultivo, la incubación y recuento de placas Petri y Petrifilm. Cada etapa en el proceso adiciona variabilidad a los resultados. Excluyendo la variación asociada a las actividades previas al análisis de las muestras (Corry *et al.* 2007).

Cuadro 7. Distribución de la Incertidumbre combinada del método 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count para el recuento de *Staphylococcus aureus*.

Matriz	Inóculo UFC/g o ml	$\bar{U}$ (%)	Aporte a la incertidumbre $\bar{U}$ (%)	
			Aplicación de la técnica	Equipo para diluciones
Vegetales	10 <sup>2</sup>	4.73	99.027	0.973
Vegetales	10 <sup>3</sup>	3.21	98.565	1.435
Vegetales	10 <sup>4</sup>	2.89	98.406	1.594
Vegetales	10 <sup>5</sup>	1.43	96.774	3.226
Vegetales	10 <sup>6</sup>	2.35	98.039	1.961
Salchicha	10 <sup>2</sup>	13.55	99.660	0.340
Salchicha	10 <sup>3</sup>	6.87	99.330	0.670
Salchicha	10 <sup>4</sup>	5.37	99.143	0.857
Salchicha	10 <sup>5</sup>	3.39	98.642	1.358
Salchicha	10 <sup>6</sup>	4.87	99.055	0.945
Leche	10 <sup>2</sup>	9.21	99.262	0.738
Leche	10 <sup>3</sup>	1.73	96.065	3.935
Leche	10 <sup>4</sup>	0.85	91.981	8.019
Leche	10 <sup>5</sup>	2.57	97.352	2.648
Leche	10 <sup>6</sup>	1.79	96.197	3.803

El error asociado al recuento manual de colonias puede llegar a ser alto. Estudios realizados han demostrado variaciones en los conteos realizados a un mismo plato por diferentes analistas de  $\pm 10$  a 18% y en conteos realizados por el mismo analista variaciones de  $\pm 5$  a 7% (Corry *et al.* 2007). La variabilidad del conteo entre analistas no debe de ser más del 10% mientras que en el conteo por el mismo analista la variación no debe ser mayor a 5% (Weissfeld 2010). Ciertamente existe un grado de error al hacer el recuento de colonias, debido a la coalescencia y diferencia de tamaños de las mismas, que influyen al momento en que los analistas realizan el conteo. Sin embargo es posible reducir ese error dando entrenamiento a los analistas para la correcta realización de prácticas microbiológicas; haciendo un uso correcto del equipo de laboratorio y siguiendo la metodología de los métodos a realizar (Corry *et al.* 2007).

Para estimar la incertidumbre combinada expandida, la incertidumbre combinada se multiplicó por el factor de cobertura  $k=2$  lo para tener un 95% de confianza (Corry *et al.* 2007; APHA 1999). Tanto los parámetros de precisión y veracidad como la incertidumbre muestran que el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano tiene la capacidad de realizar este análisis microbiológico de forma precisa y que los resultados de dicho análisis son válidos y puede ser utilizado para el análisis de diferentes tipos de alimentos. En esta verificación se utilizaron tres matrices alimenticias con el objetivo de evaluar si existe alguna diferencia al aplicar este método para diferentes alimentos. El análisis de varianza (ANDEVA) mostró que existe diferencia estadística en el porcentaje de recuperación, entre tipo de matrices alimenticias, niveles de inóculo y la interacción de matriz alimenticia y nivel de inóculo. Sin embargo no se encontró diferencia estadística entre analistas. Por esta razón la incertidumbre para el recuento de colonias se presentó de forma separada para cada tipo de matriz alimenticia y nivel de inóculo.

La incertidumbre expandida promedio para este método microbiológico fue de 4.3%. La mayoría de las estimaciones de incertidumbre basadas en el cálculo de la desviación estándar relativa para repetibilidad y reproducibilidad; rondan entre 2.0 a 22.0% y 4.1 y 31.0% respectivamente. Dependiendo del microorganismo, método analítico, y alimentos con los que se trabaje (Jarvis *et al.* 2007). Para conocer el margen de error de un resultado debe de multiplicarse el porcentaje de incertidumbre por el resultado del análisis expresado en  $\log_{10}$  UFC/g o ml. Por ejemplo si se tiene un resultado en vegetales de  $4 \log_{10}$  UFC/g (tomado de los resultados del cuadro 7) este valor tendría un margen de error de  $\pm 0.1156 \log_{10}$  UFC/g ( $4 \log_{10}$  UFC/g  $\times$  0.0289 = 0.1156  $\log_{10}$  UFC/g), y el rango del conteo sería de 3.884 a 4.1156  $\log_{10}$  UFC/g.

Por varios años los microbiólogos han expresado la incertidumbre de sus métodos de análisis como  $\pm 0.5 \log_{10}$  UFC (Corry *et al.* 2007; Jarvis *et al.* 2007), sin embargo esto nos puede llevar a sobre estimar o subestimar la variación en los resultados de los análisis microbiológicos. Ya que la variación observada en métodos para el recuento de microorganismos es grande, que según literatura consultada puede ir de 0.1 a 1.0  $\log_{10}$  UFC/g (Lombard, 2006). El reto actual en la microbiología es proveer estimaciones reales y objetivas de la incertidumbre de los métodos microbiológicos que se utilizan (Corry *et al.* 2007).

Conocer la incertidumbre de los análisis que se realizan es de suma importancia para los laboratorios de análisis microbiológico, ya que permite estandarizar la expresión de la variabilidad asociada al ensayo (Corry *et al.* 2007). Además es un requisito para los laboratorios acreditados con la norma ISO 17025, el estimar y reportar la incertidumbre de cada uno de los métodos de análisis que trabajan. En encuesta realizada por LGC Standards se determinó que el 57.1% de 198 laboratorios encuestados estimaron la incertidumbre para los métodos de recuento de *S. aureus* que usan en sus ensayos. De igual forma la encuesta reveló que el 72.9% de los laboratorios no reportan la incertidumbre al entregar resultados de los análisis que realizan (Noblett, correo electrónico, 29 de octubre de 2013). Esto debido a que los clientes no demandan conocer la incertidumbre del método, y únicamente la reportan cuando el cliente la solicita y para cumplir con acreditaciones.

La cantidad y tipo de microorganismos presentes en los alimentos indican la inocuidad y seguridad de los mismos, por lo que es importante disponer de análisis microbiológicos que brinden resultados confiables, para monitorear procesos en la industria alimentaria, verificar sistemas de inocuidad y comprobar el cumplimiento de los criterios microbiológicos establecidos (Jarvis *et al.* 2007). La inocuidad de los alimentos es de suma importancia, cada vez las organizaciones internacionales aumentan sus esfuerzos para asegurar que el consumo de alimentos no sea una amenaza para la salud de las personas y animales. Un ejemplo de ello es la nueva regulación emitida por la FDA, la ley de inocuidad (FSMA) por sus siglas en inglés. Esta regulación tiene un enfoque diferente de la inocuidad, centrada en la prevención para evitar la contaminación de los alimentos (FDA 2015). La nueva regulación exige que los análisis microbiológicos para alimentos deben ser realizados por laboratorios acreditados, que cumplan con los mayores estándares de calidad.

#### 4. CONCLUSIONES

- Se determinaron los parámetros de desempeño para el método de enumeración y confirmación de *Staphylococcus aureus* AOAC 2003.08, los cuales cumplieron con los criterios establecidos, indicando que el personal del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano es capaz de aplicar este método microbiológico y presentar resultados precisos y veraces.
- La incertidumbre combinada expandida promedio para este ensayo fue de 4.3%. Se estimó también la incertidumbre expandida para cada tipo de alimento y nivel de inóculo.
- La mayor fuente de incertidumbre en el método microbiológico AOAC 2003.08, fue la aplicación de la técnica de análisis. Representando en promedio el 97.83% de la incertidumbre expandida para este método.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda al personal del LAMZ participar en una ronda de verificación interlaboratorio con este método.
- Seguir cuidadosamente la metodología del análisis microbiológico para no incurrir en errores que puedan afectar los resultados y su credibilidad.

## 6. LITERATURA CITADA

American Association for Laboratory Accreditation. 2014. Guidelines for Estimating Uncertainty for Microbiological Counting Methods (en línea). Consultado 23 de mayo de 2015. Disponible en [https://www.a2la.org/guidance/MU\\_for\\_Micro\\_Labs.pdf](https://www.a2la.org/guidance/MU_for_Micro_Labs.pdf).

American Public Health Association (1999). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Part 1000. 20 (ed.). California. 541 p.

AOAC (association of analytical communities) INTERNACIONAL. 2004. Guidelines for laboratories performing microbiological and chemical analyses of food and pharmaceuticals. ISO/IEC 17025:1999. 57: 42-43.

Atanassova, V., A. Meindl, y C. Ring. 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham - a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. International Journal of Food Microbiology 68: 105-113.

Camaró-Sala, M.L., R. Martínez-García, P. Olmos-Martínez, V. Catalá-Cuenca, M.D. Ocete-Mochón y C. Gimeno-Cardona. 2014. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica 33(7): 31-36.

Corry, Janet, B. Jarvis, S. Passmore y A. Hedges. 2007. A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. Food Microbiology 24: 230-253.

De Buyser, M.L., B. Lombard, S.M. Schulten, P.H. In't Veld, S.L. Scotter, P. Rollier y C. Lahellec. 2003. Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2: 1999— Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. International Journal of Food Microbiology 83: 185-194.

ECA (Ente costarricense de acreditación). 2014. Guía para la validación de métodos V03 (en línea). Consultado el 22 de mayo del 2015. Disponible en [www.eca.or.cr/docus/v2/4003](http://www.eca.or.cr/docus/v2/4003).

Ellison S., L. R., M. Rosslein y A. Williams. 2012. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3 (ed.) London, UK. Eurachem/CITAC. 133 p.

Ertas, N., Z. Gonulalan, Y. Yildirim y E. Kum. 2010. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. International Journal of Food Microbiology 142: 74-77.

Hitchins, A. 1996. The International Dairy Federation's procedure for the validation of microbiological analytical methods for dairy foods. *Food Control* 7: 13–18.

ISO (Organización Internacional para Estandarización). 2003. Norma Internacional: Microbiología de alimentos y comida para animales- Protocolo para la validación de métodos alternativos. ISO/IEC 16140. 81 p.

ISO (Organización Internacional para Estandarización). 2005. Norma Internacional: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. ISO/IEC 17025. 30 p.

Jarvis, B., J. Alan, y J. Corry. 2007. Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: Comparative assessment of the precision (uncertainty) of bacterial colony counts. *International Journal of Food Microbiology* 116: 44-51.

Kérouanton, A., J. Hennekinne, C. Letertre, L. Petit, O. Chesneau, A. Brisabois, y M. De Buyser. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology* 115: 369–375.

Leclercq, A., B. Lombard, y D. Mossel. 2000. Revue bibliographique. Normaliser les methodes d'analyse dans le cadre de la securite microbiologique francaise des aliments: atout ou contrainte. *Sciences des Aliments* 20: 179–202.

Lombard, B. 2006. Estimation of measurement uncertainty in food microbiology: The ISO approach. *Accreditation and Quality Assurance* 17: 94-100.

McMahon, Wendy A., Victoria A. Aleo, and Ann M. Schultz. 2003. 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count Plate Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Types of Meat, Seafood, and Poultry: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 86 (5): 947-953.

Niemelä I., Seppo. 2002. Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Helsinki, Finland. Centre for Metrology and Accreditation. 75 p.

Nogueira, G., P. Mendonça, A. Keizo y L. Nero. 2010. 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. *Food Microbiology* 27: 447-452.

Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA). 2007. Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo (en línea). Consultado el 14 de junio de 2015. Disponible en <http://www.oga.org.gt/descargas/>.

Organismo Hondureño de Acreditación (OHA). 2015. Políticas sobre la validación de métodos (en línea). Consultado el 14 de septiembre de 2015. Disponible en [http://oha.hondurascalidad.org/politicas\\_tecnicas/Politica\\_validacion\\_metodos.pdf](http://oha.hondurascalidad.org/politicas_tecnicas/Politica_validacion_metodos.pdf).

Párraga Estrada, K.J. y Pilla Tituaña P.M. 2013. Verificación de los métodos para la determinación de coliformes totales y bacterias mesófilas aerobias en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano. Tesis Ing. Agroindustrial, Tegucigalpa, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 48 p.

Pelisser, M., C. Klein, K. Ascoli, T. Zotti, y A. Maisonnave. 2009. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:145-148.

Portocarrero, S., M. Newman y B. Mikel. 2002. *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of country-cured hams manufactured under different processing procedures. *Meat Science* 62: 267–273.

RTCA (Reglamento Técnico Centroamericano). 2009. Criterios microbiológicos para la inocuidad de los alimentos. Consultado 22 de mayo de 2015. Disponible en <http://www.ccit.hn/wp-content/uploads/2014/08/Anexo-Resolucion-No.243-2009-Criterios-Microbiologicos.pdf>.

Rentenaar, I. 1996. MicroVal, a challenging Eureka Project. *Food Control* 7: 31-36.

Schelin, J., N. Wallin, M. Thorup, R. Lindqvist, G. Barker, y P. Rådström. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2(6): 580-592.

Silbernagel, Karen M., Robert P. Jechorek, and Charles N. Carver. 2003a. 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count Plate Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Dairy Foods: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 86 (5): 963-970.

Silbernagel, Karen M., Robert P. Jechorek, and Charles N. Carver. 2003b. 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count Plate Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Types of Processed and Prepared Foods: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 86 (5): 954-962.

Silva, B., D. Caraviello, A. Rodrigues, y P. Ruegg. 2005. Evaluation of Petrifilm for the Isolation of *Staphylococcus aureus* from Milk Samples. *Journal of Dairy Science* 88: 3000-3008.

U.S. Food and Drug Administration (FDA). 2012. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook (Second Edition) (en línea). Consultado 28 de mayo de 2014. Disponible en <http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/default.htm>.

U.S. Food and Drug Administration (FDA). 2015. FDA Food Safety Modernization Act (FSMA) (en línea). Consultado 15 de septiembre de 2015. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/default.htm>.

Uyttendaele M., y J. Debevere. 2007. Validation of analytical methods used in food microbiology. *In*: G. Mead (ed.). Microbiological Analysis of Red Meat, Poultry and Eggs. Woodhead Publishing. p. 276-304.

Wehr, H. Michael and F. Frank Joseph. 2012. Standard methods for the examination of dairy products. 17 ed. Washington DC, USA, American Public Health Association (APHA). p. 11

Weissfeld, Alice S. 2010. Estimation of Uncertainty of Measurement in Microbiology. *Clinical Microbioloy Newsletter* 32(22): 171-175.

## 7. ANEXOS

### **Anexo 1.** Registro de preparación de los medios de cultivo utilizados.

<b>Medio</b>	<b>Lote</b>	<b>Marca</b>	<b>Bitácora</b>
TSA	16327B	Acumedia	BPS-LMAZ-007-FOLIO 005 BPS-LMAZ-007-FOLIO 007
TSB	107257B	Acumedia	BPS-LMAZ-007-FOLIO 005 BPS-LMAZ-007-FOLIO 005 BPS-LMAZ-007-FOLIO 007 BPS-LMAZ-007-FOLIO 008 BPS-LMAZ-007-FOLIO 011 BPS-LMAZ-007-FOLIO 015 BPS-LMAZ-007-FOLIO 017
Buffer de fosfatos	23/06/2015	J.T. Baker	

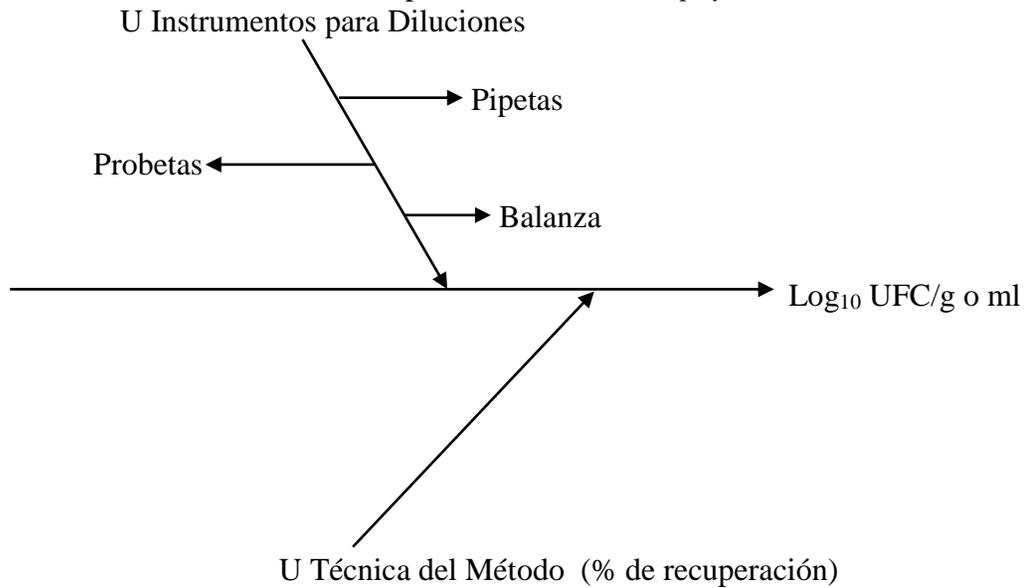
### **Anexo 2.** Lista del equipo utilizado para la verificación.

<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Código LMAZ</b>
Incubadora	Thermo Scientific	E-LMAZ-046
Autoclave	Market Forge	E-LMAZ-066
Balanza electrónica	Fisher Science Education	E-LMAZ-005
Balanza electrónica	Precisa	E-LMAZ-060
Vortex	Scientific Industries	E-LMAZ-058
Agitador peristáltico	IUL Instruments	E-LMAZ-051
Agitador peristáltico	Seaward Stomacher®	E-LMAZ-092
Termobañó	Memmert	E-LMAZ-027
Plato de calentamiento y agitación	Fisher Scientific	E-LMAZ-002
Potenciómetro	Thermo Scientific	E-LMAZ-034

### **Anexo 3.** Analistas que participaron en la verificación.

- Darwin Abel Cuellar Milian
- Mayra Márquez González
- Belinda Mayel Mateo Lopez

**Anexo 4.** Estimación de la incertidumbre para el método de *Staphylococcus aureus*.



Rango de variabilidad (tolerancia) de los instrumentos de laboratorio que fueron usados en el estudio.

Pipeta 2 ml ± 0.04 ml

Pipetas 10 ml ± 0.06 ml

Probeta 100 ml ± 0.15 ml

Probeta 500 ml ± 5 ml

La incertidumbre de los instrumentos de medición de volumen se estimó mediante una evaluación tipo B, con distribución rectangular. Usando la ecuación:

$$u = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad [4]$$

Donde:

*u*: Incertidumbre

*a*: Rango de variabilidad (tolerancia declarada por el fabricante)

Ejemplo:

$$u_{100 \text{ ml}} = \frac{0.5 \text{ ml}}{\sqrt{3}} = 0.2886 \text{ ml}$$

$$u_{2 \text{ ml}} = \frac{0.04 \text{ ml}}{\sqrt{3}} = 0.0231 \text{ ml}$$

$$u_{10 \text{ ml}} = \frac{0.06 \text{ ml}}{\sqrt{3}} = 0.0346 \text{ ml}$$

$$u_{500 \text{ ml}} = \frac{5 \text{ ml}}{\sqrt{3}} = 2.8867 \text{ ml}$$

Una vez calculada la incertidumbre para cada instrumento de medición se debe de dividir el valor obtenido para la cantidad de volumen medido con cada uno, de esta forma se obtiene la incertidumbre estándar relativa RSU que se representa con la letra  $w$ .

Ejemplo:

$$w_{90 \text{ ml}} = \frac{0.2886 \text{ ml}}{90 \text{ ml}} = 0.0032$$

$$w_{50 \text{ ml}} = \frac{0.2886 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} = 0.0058$$

$$w_{10 \text{ ml}} = \frac{0.0346 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 0.0035$$

$$w_{450 \text{ ml}} = \frac{2.8867 \text{ ml}}{450 \text{ ml}} = 0.0064$$

$$w_{1 \text{ ml}} = \frac{0.0231 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} = 0.0231$$

Luego de calcular el valor RSU se procedió a calcular el valor de la incertidumbre por dilución. Usando la fórmula:

$$w_f^2 = \frac{u_b^2 + b^2 w_a^2}{(a + b)^2} \quad [5]$$

Donde:

$w_f^2$ : RSU de dilución

$u_b^2$ : Incertidumbre del volumen del diluyente

$w_a^2$ : RSU de alícuota

$b$ : Volumen de diluyente

$a$ : Volumen de alícuota

Cálculo de la incertidumbre total de las diluciones:

$$w_F^2 = w_{f-1}^2 + w_{f-2}^2 + w_{f-3}^2 + w_{f-4}^2 \quad [6]$$

Donde:

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_{f-1}^2$ : Incertidumbre de dilución  $10^{-1}$

$w_{f-2}^2$ : Incertidumbre de dilución  $10^{-2}$

$w_{f-3}^2$ : Incertidumbre de dilución  $10^{-3}$

$w_{f-4}^2$ : Incertidumbre de dilución  $10^{-4}$

Alícuota líquida:

Dilución  $10^{-1}$ :

$$w_f^2 = \frac{2.8867^2 + (450)^2(0.0058)^2}{(50 + 450)^2} = 0.00006$$

Dilución  $10^{-2}$ :

$$w_f^2 = \frac{0.2886^2 + (90)^2(0.0032)^2}{(10 + 90)^2} + 0.00006 = 0.00008$$

Dilución  $10^{-3}$ :

$$w_f^2 = \left[ \frac{0.2886^2 + (90)^2(0.0032)^2}{(10 + 90)^2} \right] \times 2 + 0.00006 = 0.000094$$

Dilución  $10^{-4}$ :

$$w_f^2 = \left[ \frac{0.2886^2 + (90)^2(0.0032)^2}{(10 + 90)^2} \right] \times 3 + 0.00006 = 0.00011$$

Cálculo de incertidumbre total de diluciones para la muestra líquida:

$$w_F^2 = w_{f-1}^2 + w_{f-2}^2 + w_{f-3}^2 + w_{f-4}^2$$

$$w_F^2 = 0.00006 + 0.00008 + 0.000094 + 0.00011 = 0.00034$$

Alícuota sólida:

Para las muestras de vegetales mixtos y salchicha se utilizó una balanza electrónica marca Precisa (E-LMAZ-060). Con incertidumbre expandida de 0.059. Se realizó una evaluación tipo B con distribución triangular para calcular la incertidumbre estándar de la balanza.

Luego se calculó la incertidumbre estándar relativa dividiendo la incertidumbre estándar entre la cantidad en gramos pesada.

$$u_{2100\text{ g}} = \frac{0.0295\text{ g}}{\sqrt{6}} = 0.012\text{ g}$$

$$w_{50\text{ g}} = \frac{0.012\text{ g}}{50\text{ g}} = 0.00024$$

Dilución  $10^{-1}$ :

$$w_f^2 = \frac{2.8867^2 + (450)^2(0.00024)^2}{(50 + 450)^2} = 0.000033$$

Dilución  $10^{-2}$ :

$$w_f^2 = \frac{0.2886^2 + (90)^2(0.0032)^2}{(10 + 90)^2} + 0.000033 = 0.00005$$

Dilución  $10^{-3}$ :

$$w_f^2 = \left[ \frac{0.2886^2 + (90)^2(0.0032)^2}{(10 + 90)^2} \right] \times 2 + 0.000033 = 0.000067$$

Dilución  $10^{-4}$ :

$$w_f^2 = \left[ \frac{0.2886^2 + (90)^2(0.0032)^2}{(10 + 90)^2} \right] \times 3 + 0.000033 = 0.000084$$

Cálculo de incertidumbre total de diluciones para muestras sólidas:

$$w_F^2 = w_{f-1}^2 + w_{f-2}^2 + w_{f-3}^2 + w_{f-4}^2$$

$$w_F^2 = 0.000033 + 0.00005 + 0.000067 + 0.000084 = 0.00023$$

Se utilizó la sumatoria de las incertidumbres de todas las diluciones debido a que no se tiene certeza de en qué dilución se tendrá crecimiento microbiano dentro del rango contable. De esta forma se tiene un criterio más amplio al calcular la incertidumbre para el método de ensayo. Luego de haber calculado la incertidumbre total de las diluciones se calculó la incertidumbre total del conteo utilizando una evaluación de tipo A con los datos de la verificación del método para *Staphylococcus aureus*.

**Anexo 5.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en vegetales mixtos inoculados con 6 log<sub>10</sub> UFC/g.

Analista	UFC/g Inoculado	log <sub>10</sub> UFC Inoculados	Rep.	UFC/g Recuperado	log <sub>10</sub> UFC/g Recuperados	% Recuperación
A	856667	5.93	1	730000	5.86	98.82
A	856667	5.93	2	790000	5.90	99.49
A	856667	5.93	3	1060000	6.03	101.69
B	856667	5.93	1	720000	5.86	98.82
B	856667	5.93	2	880000	5.94	100.17
B	856667	5.93	3	1040000	6.02	101.52
C	856667	5.93	1	840000	5.92	99.83
C	856667	5.93	2	920000	5.96	100.51
C	856667	5.93	3	1060000	6.03	101.69
Desv. Estándar						1.15
Varianza						1.33
Promedio						100.28

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2 \quad [7]$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00023 + 0.0115 = 0.01173$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00023 \times 100}{0.01173} = 1.961\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0115 \times 100}{0.01173} = 98.039\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de 6 log<sub>10</sub> UFC/g en vegetales mixtos fue de 0.02346 (2.35%).

**Anexo 6.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en vegetales mixtos inoculados con 5 log<sub>10</sub> UFC/g.

Analista	UFC/g Inoculado	log <sub>10</sub> UFC Inoculados	Rep.	UFC/g Recuperado	log <sub>10</sub> UFC Recuperados	% Recuperación
A	117000	5.07	1	89000	4.95	97.63
A	117000	5.07	2	81000	4.91	96.84
A	117000	5.07	3	80000	4.90	96.65
B	117000	5.07	1	88000	4.94	97.44
B	117000	5.07	2	82000	4.91	96.84
B	117000	5.07	3	95000	4.98	98.22
C	117000	5.07	1	97000	4.99	98.42
C	117000	5.07	2	87000	4.94	97.44
C	117000	5.07	3	97000	4.99	98.42
Desv. Estándar						0.69
Varianza						0.48
Promedio						97.55

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00023 + 0.0069 = 0.00713$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00023 \times 100}{0.00713} = 3.226\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0069 \times 100}{0.00713} = 96.774\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de 5 log<sub>10</sub> UFC/g en vegetales mixtos fue de 0.01426 (1.43%).

**Anexo 7.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en vegetales mixtos inoculados con 4 log UFC/g.

Analista	UFC/g Inoculado	log <sub>10</sub> UFC Inoculados	Rep.	UFC/g Recuperado	log <sub>10</sub> UFC Recuperados	% Recuperación
A	12467	4.10	1	9500	3.98	97.15
A	12467	4.10	2	8200	3.91	95.44
A	12467	4.10	3	7800	3.89	94.96
B	12467	4.10	1	11400	4.06	99.10
B	12467	4.10	2	9200	3.96	96.66
B	12467	4.10	3	9200	3.96	96.66
C	12467	4.10	1	11600	4.06	99.10
C	12467	4.10	2	10000	4.00	97.64
C	12467	4.10	3	9400	3.97	96.91
Desv. Estándar						1.42
Varianza						2.01
Promedio						97.07

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00023 + 0.0142 = 0.01443$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00023 \times 100}{0.01443} = 1.594\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0142 \times 100}{0.01443} = 98.406\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de 4 log<sub>10</sub> UFC/g en vegetales mixtos fue de 0.02886 (2.89%).

**Anexo 8.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en vegetales mixtos inoculados con 3 log<sub>10</sub> UFC/g.

Analista	UFC/g Inoculado	log <sub>10</sub> UFC Inoculados	Rep.	UFC/g Recuperado	log <sub>10</sub> UFC Recuperados	% Recuperación	
A	1267	3.10	1	790	2.90	93.45	
A	1267	3.10	2	770	2.89	93.13	
A	1267	3.10	3	850	2.93	94.41	
B	1267	3.10	1	840	2.92	94.09	
B	1267	3.10	2	930	2.97	95.70	
B	1267	3.10	3	990	3.00	96.67	
C	1267	3.10	1	930	2.97	95.70	
C	1267	3.10	2	1000	3.00	96.67	
C	1267	3.10	3	1070	3.03	97.64	
						Desv. Estándar	1.58
						Varianza	2.49
						Promedio	95.27

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00023 + 0.0158 = 0.01603$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00023 \times 100}{0.01603} = 1.435\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0158 \times 100}{0.01603} = 98.565\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de 3 log<sub>10</sub> UFC/g en vegetales mixtos fue de 0.03206 (3.21%).

**Anexo 9.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en vegetales mixtos inoculados con  $2 \log_{10}$  UFC/g.

Analista	UFC/g Inoculado	$\log_{10}$ UFC Inoculados	Rep.	UFC/g Recuperado	$\log_{10}$ UFC Recuperados	% Recuperación	
A	100	1.99	1	100	2.00	100.33	
A	100	1.99	2	100	2.00	100.33	
A	100	1.99	3	100	2.00	100.33	
B	100	1.99	1	100	2.00	100.33	
B	100	1.99	2	90	1.95	97.83	
B	100	1.99	3	120	2.08	104.35	
C	100	1.99	1	100	2.00	100.33	
C	100	1.99	2	90	1.95	97.83	
C	100	1.99	3	120	2.08	104.35	
						Desv. Estándar	2.34
						Varianza	5.47
						Promedio	100.67

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00023 + 0.0234 = 0.02363$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00023 \times 100}{0.02363} = 0.973\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0234 \times 100}{0.02363} = 99.027\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de  $2 \log_{10}$  UFC/g en vegetales mixtos fue de 0.04726 (4.73%).

**Anexo 10.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en salchicha inoculada con  $6 \log_{10}$  UFC/g.

Analista	UFC/g Inoculado	$\log_{10}$ UFC Inoculados	Rep.	UFC/g Recuperado	$\log_{10}$ UFC Recuperados	% Recuperación
A	1480000	6.17	1	1090000	6.04	97.89
A	1480000	6.17	2	800000	5.90	95.62
A	1480000	6.17	3	490000	5.69	92.22
B	1480000	6.17	1	1080000	6.03	97.73
B	1480000	6.17	2	1000000	6.00	97.24
B	1480000	6.17	3	540000	5.73	92.87
C	1480000	6.17	1	1090000	6.04	97.89
C	1480000	6.17	2	1060000	6.03	97.73
C	1480000	6.17	3	560000	5.75	93.19
Desv. Estándar						2.41
Varianza						5.82
Promedio						95.82

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00023 + 0.0241 = 0.02433$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00023 \times 100}{0.02433} = 0.945\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0241 \times 100}{0.02433} = 99.055\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de  $6 \log_{10}$  UFC/g en salchicha fue de 0.04866 (4.87%).

**Anexo 11.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en salchicha inoculada con 5 log<sub>10</sub> UFC/g.

Analista	UFC/g Inoculado	log <sub>10</sub> UFC Inoculados	Rep.	UFC/g Recuperado	log <sub>10</sub> UFC Recuperados	% Recuperación	
A	165333	5.22	1	111000	5.05	96.81	
A	165333	5.22	2	143000	5.16	98.91	
A	165333	5.22	3	101000	5.00	95.85	
B	165333	5.22	1	118000	5.07	97.19	
B	165333	5.22	2	143000	5.16	98.91	
B	165333	5.22	3	88000	4.94	94.70	
C	165333	5.22	1	124000	5.09	97.57	
C	165333	5.22	2	151000	5.18	99.30	
C	165333	5.22	3	93000	4.97	95.27	
						Desv. Estándar	1.67
						Varianza	2.80
						Promedio	97.17

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00023 + 0.0167 = 0.01693$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00023 \times 100}{0.01693} = 1.358\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0167 \times 100}{0.01693} = 98.642\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de 5 log<sub>10</sub> UFC/g en salchicha fue de 0.03386 (3.39%).

**Anexo 12.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en salchicha inoculada con 4 log<sub>10</sub> UFC/g.

Analista	UFC/g Inoculado	log <sub>10</sub> UFC Inoculados	Rep.	UFC/g Recuperado	log <sub>10</sub> UFC Recuperados	% Recuperación
A	9433	3.97	1	15600	4.19	105.45
A	9433	3.97	2	9100	3.96	99.66
A	9433	3.97	3	8900	3.95	99.41
B	9433	3.97	1	15800	4.20	105.70
B	9433	3.97	2	10700	4.03	101.43
B	9433	3.97	3	9800	3.99	100.42
C	9433	3.97	1	15800	4.20	105.70
C	9433	3.97	2	11000	4.04	101.68
C	9433	3.97	3	9800	3.99	100.42
Desv. Estándar						2.66
Varianza						7.07
Promedio						102.21

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00023 + 0.0266 = 0.02683$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00023 \times 100}{0.02683} = 0.857\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0266 \times 100}{0.02683} = 99.143\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de 4 log<sub>10</sub> UFC/g en salchicha fue de 0.05366 (5.37%).

**Anexo 13.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en salchicha inoculada con 3 log<sub>10</sub> UFC/g.

Analista	UFC/g Inoculado	log <sub>10</sub> UFC Inoculados	Rep.	UFC/g Recuperado	log <sub>10</sub> UFC Recuperados	% Recuperación
A	1100	3.04	1	1090	3.04	100.11
A	1100	3.04	2	620	2.79	91.88
A	1100	3.04	3	790	2.90	95.50
B	1100	3.04	1	1090	3.04	100.11
B	1100	3.04	2	690	2.84	93.52
B	1100	3.04	3	780	2.89	95.17
C	1100	3.04	1	1240	3.09	101.76
C	1100	3.04	2	720	2.86	94.18
C	1100	3.04	3	790	2.90	95.50
Desv. Estándar						3.41
Varianza						11.62
Promedio						96.41

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00023 + 0.0341 = 0.03433$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00023 \times 100}{0.03433} = 0.670\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0341 \times 100}{0.03433} = 99.330\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de 3 log<sub>10</sub> en salchicha fue de 0.06866 (6.87%).

**Anexo 14.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en salchicha inoculada con 3 log<sub>10</sub> UFC/g.

Analista	UFC/g Inoculado	log <sub>10</sub> UFC Inoculados	Rep.	UFC/g Recuperado	log <sub>10</sub> UFC Recuperados	% Recuperación
A	1100	3.04	1	1090	3.04	100.11
A	1100	3.04	2	620	2.79	91.88
A	1100	3.04	3	790	2.90	95.50
B	1100	3.04	1	1090	3.04	100.11
B	1100	3.04	2	690	2.84	93.52
B	1100	3.04	3	780	2.89	95.17
C	1100	3.04	1	1240	3.09	101.76
C	1100	3.04	2	720	2.86	94.18
C	1100	3.04	3	790	2.90	95.50
Desv. Estándar						3.41
Varianza						11.62
Promedio						96.41

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00023 + 0.0341 = 0.03433$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00023 \times 100}{0.03433} = 0.670\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0341 \times 100}{0.03433} = 99.330\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de 3 log<sub>10</sub> en salchicha fue de 0.06866 (6.87%).

**Anexo 15.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en salchicha inoculada con  $2 \log_{10}$  UFC/g.

Analista	UFC/g Inoculado	$\log_{10}$ UFC Inoculados	Rep.	UFC/g Recuperado	$\log_{10}$ UFC Recuperados	% Recuperación	
A	110	2.04	1	130	2.11	103.43	
A	110	2.04	2	70	1.85	90.69	
A	110	2.04	3	130	2.11	103.43	
B	110	2.04	1	130	2.11	103.43	
B	110	2.04	2	70	1.85	90.69	
B	110	2.04	3	140	2.15	105.39	
C	110	2.04	1	130	2.11	103.43	
C	110	2.04	2	70	1.85	90.69	
C	110	2.04	3	140	2.15	105.39	
						Desv. Estándar	6.75
						Varianza	45.52
						Promedio	99.62

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00023 + 0.0675 = 0.06773$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00023 \times 100}{0.06773} = 0.340\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0675 \times 100}{0.06773} = 99.660\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de  $2 \log_{10}$  UFC/g en salchicha fue de 0.13546 (13.55%).

**Anexo 16.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en leche semidescremada (2% de grasa) inoculada con 6 log<sub>10</sub> UFC/ml.

Analista	UFC/ml Inoculado	log <sub>10</sub> UFC Inoculados	Rep.	UFC/ml Recuperado	log <sub>10</sub> UFC Recuperados	% Recuperación	
A	966667	5.98	1	1080000	6.03	100.78	
A	966667	5.98	2	1020000	6.01	100.45	
A	966667	5.98	3	830000	5.92	98.94	
B	966667	5.98	1	1050000	6.02	100.61	
B	966667	5.98	2	1020000	6.01	100.45	
B	966667	5.98	3	880000	5.94	99.28	
C	966667	5.98	1	1160000	6.06	101.28	
C	966667	5.98	2	1140000	6.06	101.28	
C	966667	5.98	3	900000	5.95	99.44	
						Desv. Estándar	0.86
						Varianza	0.74
						Promedio	100.28

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00034 + 0.0086 = 0.00894$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00034 \times 100}{0.00894} = 3.803\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0086 \times 100}{0.00894} = 96.197\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de 6 log<sub>10</sub> UFC/ml en leche semidescremada (2% de grasa) de 0.01788 (1.79%).

**Anexo 17.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en leche semidescremada (2% de grasa) inoculada con 5 log<sub>10</sub> UFC/ml.

Analista	UFC/ml Inoculado	log <sub>10</sub> UFC Inoculados	Rep.	UFC/ml Recuperado	log <sub>10</sub> UFC Recuperados	% Recuperación
A	101667	5.00	1	72000	4.86	97.14
A	101667	5.00	2	91000	4.96	99.13
A	101667	5.00	3	102000	5.01	100.13
B	101667	5.00	1	74000	4.87	97.34
B	101667	5.00	2	91000	4.96	99.13
B	101667	5.00	3	96000	4.98	99.53
C	101667	5.00	1	73000	4.86	97.14
C	101667	5.00	2	95000	4.98	99.53
C	101667	5.00	3	103000	5.01	100.13
Desv. Estándar						1.25
Varianza						1.57
Promedio						98.80

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00034 + 0.0125 = 0.01284$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00034 \times 100}{0.01284} = 2.648\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0125 \times 100}{0.01284} = 97.352\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de 5 log<sub>10</sub> UFC/ml en leche semidescremada (2% de grasa) de 0.02568 (2.57%).

**Anexo 18.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en leche semidescremada (2% de grasa) inoculada con 4 log<sub>10</sub> UFC/ml.

Analista	UFC/ml Inoculado	log <sub>10</sub> UFC Inoculados	Rep.	UFC/ml Recuperado	log <sub>10</sub> UFC Recuperados	% Recuperación
A	8500	3.93	1	9600	3.98	101.19
A	8500	3.93	2	9100	3.96	100.68
A	8500	3.93	3	8700	3.94	100.17
B	8500	3.93	1	9200	3.96	100.68
B	8500	3.93	2	8900	3.95	100.42
B	8500	3.93	3	8900	3.95	100.42
C	8500	3.93	1	9800	3.99	101.44
C	8500	3.93	2	9200	3.96	100.68
C	8500	3.93	3	9100	3.96	100.68
					Desv. Estándar	0.39
					Varianza	0.15
					Promedio	100.71

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00034 + 0.0039 = 0.00424$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00034 \times 100}{0.00424} = 8.019\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0039 \times 100}{0.00424} = 91.981\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de 4 log<sub>10</sub> UFC/ml en leche semidescremada (2% de grasa) de 0.00848 (0.85%).

**Anexo 19.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en leche semidescremada (2% de grasa) inoculada con 3 log<sub>10</sub> UFC/ml.

Analista	UFC/ml Inoculado	log <sub>10</sub> UFC Inoculados	Rep.	UFC/ml Recuperado	log <sub>10</sub> UFC Recuperados	% Recuperación	
A	860	2.93	1	1040	3.02	102.95	
A	860	2.93	2	940	2.97	101.25	
A	860	2.93	3	950	2.98	101.59	
B	860	2.93	1	980	2.99	101.93	
B	860	2.93	2	900	2.95	100.57	
B	860	2.93	3	890	2.95	100.57	
C	860	2.93	1	1020	3.01	102.61	
C	860	2.93	2	940	2.97	101.25	
C	860	2.93	3	940	2.97	101.25	
						Desv. Estándar	0.83
						Varianza	0.68
						Promedio	101.55

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00034 + 0.0083 = 0.00864$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00034 \times 100}{0.00864} = 3.935\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0083 \times 100}{0.00864} = 96.065\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de 3 log<sub>10</sub> UFC/ml en leche semidescremada (2% de grasa) de 0.01728 (1.73%).

**Anexo 20.** Resultados de la verificación, porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* en leche semidescremada (2% de grasa) inoculada con 2 log<sub>10</sub> UFC/ml.

Analista	UFC/ml Inoculado	log <sub>10</sub> UFC Inoculados	Rep.	UFC/ml Recuperado	log <sub>10</sub> UFC Recuperados	% Recuperación
A	97	1.98	1	9100	2.08	104.87
A	97	1.98	2	120	2.15	108.40
A	97	1.98	3	140	1.95	98.32
B	97	1.98	1	90	2.11	106.39
B	97	1.98	2	130	2.15	108.40
B	97	1.98	3	140	1.95	98.32
C	97	1.98	1	90	2.11	106.39
C	97	1.98	2	130	2.15	108.40
C	97	1.98	3	140	1.95	98.32
Desv. Estándar						4.57
Varianza						20.85
Promedio						104.20

Cálculo de la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ : Incertidumbre total

$w_F^2$ : Incertidumbre total de diluciones

$w_C^2$ : Incertidumbre de la técnica

$$\sum w^2 = 0.00034 + 0.0457 = 0.04604$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00034 \times 100}{0.04604} = 0.738\%$$

Incertidumbre de la técnica:

$$w_C^2 = \frac{0.0457 \times 100}{0.04604} = 99.262\%$$

Para tener la incertidumbre expandida se multiplicó la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura  $k=2$  (para una cobertura del 95%) (Corry *et al.*, 2007). La incertidumbre expandida en el análisis de *S. aureus* con concentración de 2 log<sub>10</sub> UFC/ml en leche semidescremada (2% de grasa) de 0.09208 (9.21%).