



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“PRESENCIA DE BACTERIAS DE LOS GÉNEROS *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Brucella abortus* Y SU PERFIL DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LECHE CRUDA BOVINA PROCEDENTE DE TUNSHI Y SAN ANDRES”

Trabajo de titulación presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: JHONNATAN ANDRES GRANIZO PUMAGUALLI

TUTOR: PHD FÉLIX ANDUEZA L

Riobamba -Ecuador

©2016, Jonathan Andrés Granizo Pumagualli

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Jhonnatan Andrés Granizo Pumagualli

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación “**PRESENCIA DE BACTERIAS DE LOS GÉNEROS *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Brucella abortus* Y SU PERFIL DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LECHE CRUDA BOVINA PROCEDENTE DE TUNSHI Y SAN ANDRES**”, de responsabilidad del señor Jhonnatan Andrés Granizo Pumagualli, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Félix Andueza

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dr. Gerardo Medina

MIEMBRO DE TRIBUNAL

**NOTA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jonathan Andrés Granizo Pumagualli, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría, y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación

Riobamba 01 de Marzo del 2016

JHONNATAN ANDRES GRANIZO PUMAGUALLI

060423608-3

DEDICATORIA

Estos años de vida Politécnica han sido de lucha, constancia, sacrificio, esfuerzo y dedicación, atravesando por momentos gratos y otros difíciles pero manteniendo firme la meta a alcanzar, por eso este trabajo lo dedico a esas personas que estuvieron siempre conmigo:

A Dios por ser, bendecirme y llenarme de valentía para enfrentar todas las barreras y adversidades que la vida me puso para alcanzar esta meta.

A mi padre Mario y mi madre Cecilia por ser la base fundamental de mi vida y siempre alentarme para llegar a esta meta, quienes fueron los coautores y testigos de este sueño.

A mis hermanos Cristian, Johanna y Jorge que siempre estuvieron pendientes de mí, y me ofrecieron su ayuda incondicional.

A mi familia por compartir junto a mí nuevas experiencias y en cada una de ellas sembrar el deseo de superación y anhelo de triunfo en la vida.

A mis amigos y amigas que compartieron conmigo momentos inolvidables y brindarme su amistad sincera demostrándome que puedo contar con ellos en todo momento.

Jhonnatan

AGRADECIMIENTO

A mis padres por apoyarme moral y económicamente en la persecución de mis ideales

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por abrirme sus puertas hacia la enseñanza para poder convertirme en una profesional competente.

Al PhD. Félix Andueza y al PhD. Gerardo Medina, mis tutores, por el todo apoyo brindado durante la realización del trabajo.

De manera muy especial al Dr. Carlos Espinoza quien me brindó su apoyo, conocimientos y amistad cuando no tenía que hacerlo. ¡Muchas Gracias!

A las Dras. Aida, por ayudarme con toda disposición en lo que pudiera, la recordaré con mucho cariño.

A Gaby por no abandonarme en la conquista de esta meta y estar siempre presta a ayudarme.

.

A todos, ¡Gracias!

Jhonnatan

ÍNDICE GENERAL

Págs.

INTRODUCCION.....	1
CAPITULO I.....	5
1. MARCO TEORICO.....	5
1.1. Situación actual en la producción de leche en Ecuador.....	5
1.2. Definiciones de leche.....	5
1.2.1. <i>Leche:</i>	5
1.2.2. <i>Leche Cruda:</i>	5
1.3. Definiciones bromatológicas	6
1.4. Tipos de leche.....	6
1.5. Composición de la leche	6
1.6. Características de la leche.....	7
1.6.1. <i>Características Organolépticas</i>	7
1.6.2. <i>Características Físicas</i>	8
1.7. Microorganismos en la leche cruda.....	9
1.7.1. <i>Bacterias Gram Positivas</i>	10
1.7.2. <i>Bacterias Gram negativas</i>	10
1.7.3. <i>Requisitos Microbiológicos</i>	11
1.7.4. <i>Control de la leche antes y durante su proceso</i>	11
1.7.5. <i>Contaminantes biológicos</i>	11
1.7.6. <i>Contaminantes químicos</i>	13
1.7.7. <i>Adulterantes en Leche</i>	14
1.8. La leche y bacterias patógenas	14
1.8.2. <i>Escherichia coli</i>	17
1.8.3. <i>Brucella abortus</i>	18
1.9. Uso de antibióticos en ganadería lechera	19
1.10. Residuos de Medicamentos Veterinarios	20
1.10.1. <i>Contaminación de la Leche por Antibióticos</i>	20
1.10.2. <i>Mecanismos de Resistencia antimicrobiana</i>	21
1.10.3. <i>Resistencia Intrínseca VS. Adquirida</i>	22
1.10.4. <i>Importancia en la Salud Pública</i>	23
1.11. Métodos de identificación y confirmación de la presencia microorganismos indicadores en la leche cruda.....	24

1.11.1.	<i>Placas Petrifilm</i>	24
1.11.2.	<i>MicrogenTM GN-ID Identificación</i>	25
1.11.3.	<i>Tinción de Gram</i>	26
1.11.4.	<i>Prueba de la Catalasa</i>	26
1.11.7.	<i>Suplemento selectivo para Brucella</i>	27
1.11.8.	<i>Agar Cerebro-Corazón</i>	27
1.11.9.	<i>Agar Eosina azul de metileno (EMB)</i>	28
1.11.10.	<i>Agar Manitol Salado</i>	28
1.12.3.	<i>Descripción de los discos de antibióticos</i>	30
CAPITULO II		34
2.1.	Lugar de la investigación	34
2.2.	Factores de estudio	34
2.2.1.	<i>Población</i>	34
2.2.2.	<i>Muestra</i>	35
2.3.	Materiales, Equipos y Reactivos	35
2.4.	Metodología	36
2.4.1.	<i>Recolección y transporte de muestras</i>	37
2.4.2.	<i>Preparación de la suspensión inicial y diluciones</i>	37
2.4.3.	<i>Recuento de Staphylococcus aureus por la técnica de Petrifilm según 3M</i>	37
2.4.4.	<i>Recuento E. coli/ Coliformes por la técnica de Petrifilm según 3M</i>	39
2.4.5.	Recuento Brucella	39
2.4.5.1.	<i>Preparación del medio:</i>	39
2.4.6.	<i>Prueba confirmatoria del crecimiento de E. coli en agar eosina azul de metileno</i>	40
2.4.7.	<i>Confirmación de Staphylococcus aureus mediante fermentación del manitol.</i>	41
2.4.8.	<i>Aislamiento y purificación</i>	42
2.4.9.	<i>Tinción Gram</i>	43
2.4.10.	<i>Prueba de la Oxidasa</i>	44
2.4.11.	<i>Producción de catalasa</i>	44
2.4.12.	<i>Identificación de bacterias mediante el Sistema de Identificación Bioquímica MicrogenTM</i>	44
2.4.13.	<i>Difusión en disco</i>	46
CAPITULO III		50
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50

3.1. Análisis microbiológico de la leche cruda	50
3.1.1. Recuento de <i>Escherichia coli</i> de la leche cruda	50
3.1.2. Crecimiento de <i>E. coli</i> en agar eosina azul de metileno.	52
3.1.3. Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> de la leche cruda	53
3.1.4. Fermentación en agar manitol salado por presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en muestras de leche cruda	55
3.1.6. Tinción Gram	58
3.1.7. Lectura de sistema <i>Microgen Identification System</i>	59
3.1.8. Antibiograma de <i>Escherichia coli</i>	61
3.1.9. Antibiograma de <i>Staphylococcus aureus</i>	65
CONCLUSIONES	69
RECOMENDACIONES	70
BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

Págs.

Tabla 1.1: Clasificación de la microbiota de la leche.....	9
Tabla 2.1: Requisitos microbiológicos de la leche cruda.....	11
Tabla 3.1: Fuentes externas de contaminación de la leche cruda.....	12
Tabla 4.1: Enfermedades más destacables por consumo de leche cruda contaminada.....	15
Tabla 5.1: Taxonomía del <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Tabla 6.1: Taxonomía de la <i>Escherichia coli</i>	17
Tabla 7.1: Taxonomía de la <i>Brucella abortus</i>	18
Tabla 8-1: Límites máximos residuales (LMR) de antimicrobianos en leche.....	19
Tabla 9.1: Tiempo medio de permanencia en diferentes partes de aplicación de diferentes antibióticos.....	21
Tabla 10.1: Sensibilidad bacteriana a los antibióticos.....	30
Tabla 1.3: Recuento de microorganismos <i>Escherichia coli</i> totales en leche cruda.....	50
Tabla 2.3: Recuento de microorganismos <i>Staphylococcus aureus</i> totales en leche cruda.....	53
Tabla 3.3: Recuento de microorganismos <i>Brucella abortus</i> Totales en leche cruda.....	56
Tabla 4.3: Identificación de bacteriana por sistema Microgen Identification System.....	59
Tabla 5.3: Porcentaje de resistencia y sensibilidad de <i>Escherichia coli</i> frente a 6 antibióticos.....	61
Tabla 6.3: Porcentaje de resistencia y sensibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a 7 antibióticos.....	65

INDICE DE FIGURAS:

Págs.

Figura 1.1: Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana.....	29
Figura 1.2: Mapa de la ubicación de San Andrés.....	34
Figura 2.2: Siembra, incubación e interpretación de las placas Petrifilm.....	38
Figura 3.2: Tabla de colores Microgen™ GnA+B-ID System.....	45
Figura 4.2: Ejemplo de la hoja de resultados de Microgen.....	45
Figura 5.2: Selección de las colonias bien aisladas para el inóculo.....	46
Figura 6.2: Estandarización del Inóculo.....	47
Figura 7.2: Colocación y presionado de los disco en la superficie de la placa.....	48
Figura 7.2: Medición de los halos de inhibición en la parte posterior de la placa.....	49

INDICE DE GRAFICOS

Págs.

Gráfico 1.3: Recuento de e <i>Escherichia coli</i> en leche cruda.....	51
Gráfico 2.3: Cuantificación de <i>Staphylococcus aureus</i> en leche cruda.....	54
Gráfico 3.3: Recuento de <i>Brucella abortus</i> en leche cruda.....	57
Gráfico 3.3: Porcentaje de resistencia y sensibilidad de <i>Escherichia coli</i> frente a antibióticos.....	63
Gráfico 4.3: Porcentaje de resistencia y sensibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a antibióticos.....	66

RESUMEN

Se realizó el análisis microbiológico y la resistencia a antibióticos de las bacterias aisladas de la leche cruda de bovino expendida en la Empresa de Lácteos “La Herencia” en San Andrés y en la empresa de lácteos “Santa Fe” en Tunshi. La recolección y transporte de las muestras evaluadas en cada uno de los muestreos se efectuó de acuerdo a lo establecido en la Norma NTE INEN 0004. Los indicadores microbiológicos que se analizaron para determinar la calidad higiénico-sanitaria fueron, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella* por medio de Placas Petrifilm 3M, en el caso de la *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y cultivo en agar Farrell en el caso de *Brucella*, verificando la existencia de las bacterias por medio de pruebas confirmatorias como la prueba de la oxidasa, siembra en agar azul de metileno, tinción Gram y Kit Microgen™ GN-ID Identificación. El recuento de *Escherichia coli*, sobrepasó los límites permitidos según el Reglamento Técnico RTCR: 401-2006 en el 100% (6/6), ya que los valores obtenidos en el recuento van de 3000 UFC/mL a 102333,3 UFC/mL y la cantidad estándar máxima permisible para esta bacteria es de 100 UFC/mL. El conteo de *Staphylococcus aureus* resultó ser superior al valor de referencia (máximo 500 UFC/mL) oscilando entre 23.333 UFC/mL y 58.666 UFC/mL. Las pruebas confirmatorias como la coagulasa, siembra en agar manitol salado, tinción Gram y Kit Microgen™ GN-ID Identificación, coincidieron con el crecimiento en placas Petrifilm para *Staphylococcus*. En el caso de la *Brucella* no hubo crecimiento (0/9) en el agar modificado de cerebro-corazón con suplemento selectivo para el aislamiento de *Brucella*. El perfil de resistencia antimicrobiana en las bacterias identificadas se realizó por el método de difusión en agar según Kirby Bauer. *Escherichia coli* demostró ser resistencia frente a ampicilina, de la misma manera un 33,3 % (1/3) lo fue a la Tetraciclina y un 33,3 % (1/3) a la estreptomycin respectivamente, el 100% de *Escherichia coli* fueron sensibles frente a gentamicina y nitrofurantoína y kanamicina. *Staphylococcus aureus* fue resistente únicamente a penicilina y el 100% de ellas mostraron sensibilidad ante ciprofloxacino, clindamicina, amikacina, tetraciclina, cefoxitin y eritromicina. Se concluyó que la calidad bacteriológica de la de leche cruda comercializada es defectuosa, y que los microorganismos presentaron mayor resistencia a los antibióticos ampicilina, estreptomycin, tetraciclina y penicilina. Se recomienda al Ministerio de Salud y organismos encargados realizar en forma permanente la capacitación y control con personal técnico y capacitado, para proteger la salud pública y tener productos de calidad.

PALABRAS CLAVE: <SAN ANDRES [CANTON]> <TUNSHI [PARROQUIA]>
<CHIMBORAZO [PROVINCIA]> <LECHE CRUDA> <MICROORGANISMOS>
<INDICADORES DE CALIDAD HIGIENICO-SANITARIO> <ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO> <ANTIBIOGRAMA> <RESISTENCIA BACTERIANA>

ABSTRACT

A microbiological analysis and antibiotic resistance of bacteria isolated from raw milk of bovine expended in the dairy Company "La Herencia" in San Andrés and the dairy company "Santa Fe" in Tunshi was performed. The collection and transport of samples evaluated in each one of the samples was conducted in accordance with the provisions of the Standard NTE INEN 0004 standard. The microbiological indicators which were analyzed to determine the hygienic-sanitary quality were, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella* by Petrifilm plates 3M, in the case of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and agar culture Farrell in the case of *Brucella*, verifying the existence of bacteria through confirmatory tests as the test of oxidase, seed in agar methylene blue and Gram staining kit Microgen™ GN-ID identification. The count of *Escherichia coli*, exceeded the limits allowed under the Technical Regulations RTCR: 401-2006 in 100% (6/6), since the values obtained in counts range of 3000 CFU / mL to 102,333.3 CFU / mL and the standard amount maximum allowable for this bacteria is 100 CFU / mL. *Staphylococcus aureus* count turned out to be higher than the reference value (maximum 500 CFU / mL) ranging from 23,333 CFU / mL and 58,666 CFU / mL. Confirmatory tests such as coagulase, mannitol salt agar, Gram staining and Kit Microgen™ GN-ID identification, coincided with the growth of *Staphylococcus* Petrifilm plates. For *Brucella* was no growth (0/9) in the modified agar brain - heart with selective supplement for the isolation of *Brucella*. The profile of antimicrobial resistance in bacteria identified was performed by the agar diffusion method according to Kirby Bauer.

Escherichia coli showed resistance to ampicillin, in the same manner 33.3% (01/03) was the Tetracycline and a 33.3% (01/03) to the respectively streptomycin, 100% of *Escherichia coli* were sensitive to kanamycin and gentamicin and nitrofurantoin. *Staphylococcus aureus* were resistant only to penicillin and 100% of them showed sensitivity to ciprofloxacin, clindamycin, amikacin, tetracycline, erythromycin and ceftiofur. It was concluded that the bacteriological quality of raw milk marketed is defective, and the microorganisms showed higher resistance to antibiotics as: ampicillin, streptomycin, tetracycline and penicillin. It is recommended to the Ministry of Health and agencies perform to have a permanent training and control with technical and trained personnel to protect public health and to have quality products.

KEYWORDS: SAN ANDRES (CANTON) -TUNSHI (PARISH) – CHIMBORAZ (PROVINCE) - RAW MILK - MICROORGANISMS - QUALITY INDICATORS HIGIENIC-SANITARY - MICROBIOLOGIC ANALYSIS - ANTIBIOGRAM - BACTERIAL RESISTANCE

INTRODUCCION

Identificación Del Problema

La leche cruda debido a su composición y su riqueza de nutrientes, conlleva un riesgo ya que en ella pueden proliferar microorganismos que pueden ser patógenos para el hombre, debido a que no ha sido sometida a ningún tipo de tratamiento que le ayude a eliminar cualquiera de estos microorganismos. (FAO, 2010) Estos microorganismos pueden tener distintos efectos que van a alterar las características organolépticas del producto y afectan su calidad final, poniendo en riesgo al consumidor. (Chavarrias, 2008).

En el 2013 en la producción lechera se registraron un promedio de producción nacional de unos 6,3 millones de litros de leche diario, ubicando a la provincia de Chimborazo en el puesto número cuatro con una producción de 10,69 %, procedente de un total de 332, 45 miles de cabeza de ganado vacuno. (INEC, 2013). Estos datos nos permiten darnos cuenta de la magnitud del problema, por lo que se debe tener como valor fundamental la higiene para preservar el estado de la leche, su vida útil como materia prima y así asegurar su inocuidad y calidad. (Ganadera, 2015)

Si hablamos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) en la provincia de Chimborazo en el año 2014 se presentaron 3018 casos, en donde se ubica con la mayor tasa en cuenta morbilidad por enfermedades diarreicas de origen infeccioso que generalmente son provocadas por alimentos perecederos como la leche. (MSP, 2014)

Por otro lado uno de los problemas de los países del tercer mundo entre ellos el Ecuador, es el uso indiscriminado de fármacos veterinarios en las ganaderías lo que deriva en problemas de residuos de medicamentos en los productos y subproductos de consumo humano, en este caso la leche cruda. El uso indiscriminado de fármacos que se deriva de un ineficiente control en el expendio y el uso de los mismos, acompañada de la falta de conocimiento ha hecho que los Antibióticos sean los principales fármacos presentes en la leche, ya que no se tiene en cuenta la farmacodinamia del producto y que deriva en problemas como residuos de medicamentos en la leche y afectan directamente a la calidad del producto y al consumidor. (Máttar, S. Calderón, A.Sotelo, D. Sierra M., 2009)

Organismos como la Organización Mundial de la salud (OMS), recalca el problema de la resistencia antibióticos que se ha convertido en un problema de salud pública, y en particular a los antibióticos, revelando que esta grave amenaza ya no es una previsión, sino se ha convertido ya en una realidad que puede afectar a cualquiera independiente de la edad, raza, o país. (OMS, 2014)

Uno de los aspectos muy importantes por los que el profesional Bioquímico Farmacéutico debe velar es el de controlar la calidad del producto que va ser consumido por la población, desde la recolección de la leche hasta las plantas procesadoras, para evitar que sustancias ajenas como residuos de fármacos o microorganismos patógenos se incorporen en la misma y puedan exponer a daños al consumidor. (Díaz, 2008)

Formulación del problema

Problema General

¿La leche cruda bovina procedente de Tunshi y San Andrés tiene la presencia de bacterias de los géneros *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Brucella abortus* y presenta resistencia antimicrobiana?

Como ya mencionamos la provincia de Chimborazo es una de las que presenta mayor producción y consumo de leche cruda, Tunshi y San Andrés al ser pueblos rurales de la provincia no cuentan con los conocimientos necesarios en cuanto a una adecuada cadena agroalimentaria, por lo que la leche que producen puede traer problemas de salud para el consumidor.

Por ello es necesario que exista una capacitación tanto del productor como de la persona que va expender la leche, ya que la gente que habita en estas localidades es campesina y realiza la recolección de leche de una forma artesanal para después venderla sin ningún tipo de tratamiento o cuidado que puede ser perjudicial para el consumidor, esto se debe a que desconocen de las buenas prácticas de manufactura como de las políticas y programas gubernamentales que brindan ayuda para una mejor producción, inocuidad y calidad.

El Servicio Ecuatorial de Normalización como organismos internacionales establece parámetros que la leche cruda debe cumplir para que sea apta para el consumo humano, para evitar las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS), que son aún muy comunes en nuestra población por lo que pretende hacer un estado microbiológico de la leche cruda acompañada de un antibiograma para ver si existen residuos de antibióticos, de esta manera podemos evidenciar si nuestra leche en estudio es apta para el consumo y cuenta con la calidad necesaria para ser distribuida. (FDA, 2015)

Debido a que en nuestro país existe una gran abundancia de recursos naturales, y en nuestra provincia el sector ganadero es uno de ellos, que gracias a las condiciones climáticas y los amplios campos hacen que sea una actividad muy productiva, por lo que la industria láctea se ha posicionado y ocupa un gran lugar, debemos tener en cuenta las bacterias que son causantes de las patologías.

Antecedentes de la Investigación

Existen una serie de estudios previos sobre esta problemática ya que se ha convertido en un problema no solo a nivel nacional sino mundial, el nuevo informe de la OMS; (2014) basado en datos de 114 países, ofrece el panorama más general que se ha obtenido hasta la fecha acerca de la resistencia a los antibióticos. En este nuevo informe revela que esta grave amenaza ha dejado de ser una previsión para el futuro y es ya en todas las regiones del mundo una realidad que puede afectar a cualquier persona de cualquier edad en cualquier país. La resistencia que se produce cuando las bacterias sufren cambios que hacen que los antibióticos dejen de funcionar en las personas que los necesitan como tratamiento para las infecciones es ya una gran amenaza para la salud pública. (OMS, 2014).

Máttar, S; y sus colaboradores (2009), en una publicación en la revista Salud Publica se realizó un estudio sobre Detección de Antibióticos en Leches en donde se determinó la presencia de antibióticos en leches crudas y procesadas ya que es un problema de salud pública. Se realizaron tres muestreos con intervalo de dos meses, realizando pruebas físico-químicas y pruebas de sensibilidad a antibióticos, (Total antibiotic Bio K 331 (BioX Diagnostic® Jemelle, Belgique). Se determinó el límite de sensibilidad de la prueba con controles positivos de penicilina 0.004UI/ml, oxitetraciclina 0.100 µg/ml y cloramfenicol 5.000 µg/ml, realizando diluciones seriadas dobles. (Salim Máttar, 2009)

Diaz (2008); en su tesis de grado que se realizó en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en la Facultad de Ciencia Pecuarias se realizó la “DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y SULFONAMIDAS EN SEIS MARCAS COMERCIALES DE LECHE DE MAYOR CONSUMO EN LA CIUDAD DE RIOBAMBA” en donde se hizo un estudio microbiológico de las seis marcas de leche mediante la cuantificación de Aeróbicos mesófilos y coliformes totales, y siendo el resultado positivo a las pruebas efectuadas en tres de las marcas sometidas a estudio, lo que representa al 50% de las marcas de mayor consumo. (Diaz, 2008)

Buñay, (2015) y asociados en su tesis de grado que se hizo en la Universidad de Cuenca de la Facultad de Ciencias Químicas se realizó la “DETERMINACIÓN DEL RECUENTO DE AEROBIOS MESÓFILOS EN LECHE CRUDA QUE INGRESA A INDUSTRIAS LACTO OCHOA - FERNÁNDEZ CIA. LTDA” el método aplicado fue un recuento en placas Petrifilm en donde se determinó un contenido de microorganismos Aerobios mesófilos promedio de $6,8 \times 10^6$

UFC/ml, con un mínimo de $2,5 \times 10^5$ UFC/ml y máximo de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml; lo cual contrastándose con el valor límite máximo permitido en la Norma INEN 9:2012 ($1,5 \times 10^6$ UFC/ml) nos demuestra que el 51,2 % de las muestras que se analizaron tienen un valor superior al dictaminado por la Norma anteriormente citada. (Buñay, Peralta, 2015)

Faria, (2011) y colaboradores en una publicación en una revista científica se determinó Sensibilidad a los Agentes Antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito, en donde la sensibilidad a los agentes antimicrobianos se determinó por el método de difusión en placa (Kirby-Bauer). Sólo dos muestras de leche presentaron residuos de antimicrobianos. Los mayores porcentajes de resistencia en las diferentes especies bacterianas aisladas se encontraron frente a los antibióticos beta-lactámicos. (Faria. Leal. Pool., 2011)

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1. Situación actual en la producción de leche en Ecuador

En los últimos años el desarrollo ganadero ha tenido un gran avance, ya que en Ecuador existe políticas Agropecuarias mediante Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, dirigidas a asociaciones de ganaderos con el fin de mejorar la calidad e inocuidad de la leche, lo que permite el alza de precios y la desaparición de intermediarios, con asistencia técnica frecuente y financiamiento parcial destinados a pequeños y medianos ganaderos. (MAGAP, 2015)

Ganaderos se han beneficiado de esta política que ha estado contribuyendo el desarrollo de la producción en una buena proporción, sin embargo estimamos que existen distintas causas por las que los campesinos no las gestionan, una de ellas es por desconocimiento, sobre todo en lugares en zonas rurales de poco alcance, otro inconveniente es que les es difícil la transición a nuevas estrategias políticas, y a llevar asociaciones por desacuerdos frecuentes y la disponibilidad entre ellos. (MAGAP, 2015)

1.2. Definiciones de leche

1.2.1. *Leche:*

Producto de la secreción mamaria de animales bovinos lecheros sanos, obtenida mediante un ordeño diario, higiénico, sin ninguna adición o extracción, destinada a un tratamiento posterior para su consumo. (INEN, 2012)

1.2.2. *Leche Cruda:*

Leche que no ha sido sometida a ningún tratamiento térmico, es decir su temperatura no ha superado a la de la leche inmediatamente después de ser extraída de la ubre (no más de 40 °C). (INEN, 2012)

1.3. Definiciones bromatológicas

La FDA 2015, define a la leche cruda como “la secreción limpia y fresca obtenida por el ordeño de vacas sanas, adecuadamente criadas y alimentadas, excluyéndose aquella secreción obtenida 5 días antes y 5 días después del parto, o durante el periodo necesario para que la leche esté libre de calostro”. (FDA, 2015)

“La leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenida mediante uno o más ordeños, sin ninguna ubicación de adición o extracción, destinados al consumo como leche líquida o elaboración ulterior.” (CODEX, 2006)

1.4. Tipos de leche

La Norma Mexicana la clasifica:

- “Leche cruda
- Leche para consumo humano
- Leche pasteurizada
- Leche ultra pasteurizada
- Leche evaporada
- Leche condensada azucarada
- Leche en polvo o deshidratada

La Norma Técnica Ecuatoriana 12 (1973, p. 1) da los siguientes tipos de leche:

- “Leche fresca.
- Leche homogeneizada (pasteurizada o esterilizada).
- Leche descremada o semidescremada.”

1.5. Composición de la leche

La leche es considerada como una mezcla tanto química como física, siendo esta una verdadera dispersión coloidal, utilizando como medio dispersión el agua, la leche es un líquido muy nutritivo ya que consta de más de 100 sustancias que se encuentran ya sea en emulsión, suspensión o solución en el agua. (Meza, 2013)

La leche es un producto de origen animal que tiene un alto valor nutricional y también un alto grado de digestibilidad por lo que se ha convertido en alimento muy importante en la alimentación humana, está compuesta por Agua en un 87%, caseína 2,9 %, Albumina 4.9 %, Alfa lactoalbumina 0.5 %, Beta lactoalbumina 0.2 %, Fosfolípidos 0.1%, Grana neutra en un 3.7 %, Ácido cítrico 0.2 %. Los minerales presentes en la leche son: Calcio, Magnesio, Potasio, Cloro, Fosforo, Azufre, Hierro Y Azufre. (Diaz, 2008)

Además posee azúcares fermentables, por lo que es frecuente que ocurra fermentación ácida por las bacterias o gérmenes formadores de ácido así la leche sufre modificaciones. Por esto debido a su compleja composición se debe tener un control higiénico estricto, ya que la leche cruda es un excelente medio de cultivo para numerosos microorganismos por su alto contenido de agua, el pH casi neutro y riqueza en nutrientes. (Diaz, 2008)

1.6. Características de la leche

1.6.1. Características Organolépticas

Color: el color normal de la leche es blanco, el cual se le atribuye a la reflexión de la luz por las partículas del complejo caseinato-fosfato cálcico en suspensión coloidal por los glóbulos de grasa en emulsión. (Buñay, Peralta, 2015)

Las leche que provienen de animales mastíticos o que han sido retenidas presentan un color gris amarillento, y si presenta un color rosado puede ser por resultado de la presencia de sangre o microorganismos. (Buñay, Peralta, 2015)

Cuando presenta una coloración amarillenta-verdosa se debe a una adulteración con suero de quesería, toma esa coloración por la riboflavina. (Buñay, Peralta, 2015)

Olor: la leche que recién ha sido ordeñada tiene un ligero olor a medio ambiente de donde ha sido obtenida, pero después de un tiempo desaparece. Su olor es difícil de percibir, salvo que sea un olor ajeno de los utensilios, de los recipientes de almacenamiento, microorganismos, alimentos. (Buñay, Peralta, 2015)

Sabor. Su sabor no es dulce ni amargo, si más bien un saber un poco dulce debido a su contenido de lactosa. A veces puede presentar un sabor ácido debido a un porcentaje alto de acidez de la leche de 0.2-0.3 de ácido láctico. (Buñay, Peralta, 2015)

Textura: debe ser de consistencia líquida, pegajosa y ligeramente viscosa. Esto se debe al contenido de Azúcares, sales disueltas en ella y caseína. (SENA, 1997)

Opacidad: la leche es opaca aun en capas muy delgadas y esto se debe a la presencia de caseína, grasas y sales disueltas, ya que ellas no permiten que pase la luz. (SENA, 1997)

1.6.2. Características Físicas

Densidad: es la relación que existe entre la masa y el volumen de una sustancia. La densidad de la leche está directamente relacionada con la cantidad de grasa, sólidos no grasos y agua que contenga la leche. La densidad de la leche puede fluctuar entre 1,029 a 1,033 g/cm³ a una temperatura de 15 °C. (Ortega, 2007)

pH: Las variaciones de pH varían dependiendo del estado de las glándulas mamarias, la cantidad de CO₂ disuelto en la leche, el desarrollo de microorganismos, por desdoblamiento de lactosa en ácido láctico etc. El pH de la leche presenta un valor de 6,5 y 6,65 es decir ligeramente ácido. (Gonzales, 2010)

Acidez: la acidez presentada por la leche cruda a la titulación es el resultado de varias acciones, las cuales son responsables de la acidez natural

- Acidez de la caseína autógena cerca de 2/5 de la acidez natural
- Acidez de las sustancias minerales, CO₂ y ácidos orgánicos, cerca de 2/5 de la acidez natural
- Reacciones secundarias de los fosfatos, cerca de 1/5 de la acidez natural.

La leche generalmente posee una acidez de 0.15 a 0.16 %. Una acidez menor a 15 % puede ser producto de mastitis o del agüado de la leche y si es superior de 16 % es producida por acción de contaminantes microbiológicos. (Gonzales, 2010)

Punto de congelación: Una de las características más constantes de la leche es el punto de congelación que, en general, es de -0.539 °C como valor promedio, en un rango que va más o menos de -0.513 a -0.565 °C. Esta propiedad nos permite determinar la adición de agua ya que esta al congelarse va a influir en el punto de congelación. (Avila, J. Morales, F. Fernando, P., 2011)

Calor específico: es el número de calorías necesarias que se necesita para elevar 1°C la temperatura de la unidad de peso de la leche. El calor específico de la leche entera esta entre 0.93 -0.94 cal/g°C. (Avila, J. Morales, F. Fernando, P., 2011)

Índice de refracción: este valor fluctúa entre 1.3440 y 1.3485 y es el resultado de la combinación de los índices de refracción de todos los componentes de la leche fase discontinua (solutos) y continua (Agua) de la leche. Cuando la proporción normal de solventes y de solutos se modifica, por la adición de solidos extraños o de agua respectivamente, el índice de refracción va variar. (Avila, J. Morales, F. Fernando, P., 2011)

Punto de Ebullición: la temperatura a que la leche entra en ebullición es de 100,17 °C. , es decir ligeramente superior a la que presenta el agua (100 °C.) a nivel del mar. (Buñay, Peralta, 2015)

Viscosidad: la leche fresca es un poco más viscosa que el agua, tiene un valor de 1,7 y 2,2 centipoises para la leche cruda. Al aumentar la temperatura disminuye la viscosidad. (Buñay, Peralta, 2015)

1.7. Microorganismos en la leche cruda

La leche a diferencia del agua no contiene microbiota bacteriana propia y puede que al salir de la ubre se esté. Pero debido a su composición química y su gran contenido de agua es un excelente medio de cultivo para microorganismos. De los que se puede encontrar unos beneficiosos como por ejemplo las bacterias lácticas y otros que son alterantes o perjudiciales para la salud. (FDA, 2015)

Esto puede ocurrir desde las zonas inferiores del interior de las ubres, como también de contaminantes externos, de utensilios de lechería como tanques, tuberías ordeñadoras, etc. Así también la recogida, el almacenaje y transporte van a jugar papeles fundamentales en la calidad de la leche cruda, por lo que deben realizarse con la máxima higiene posible. (FDA, 2015)

Tabla 1.1. Clasificación de la microbiota de la leche

BACTERIAS GRAM POSITIVAS	BACTERIAS GRAM NEGATIVAS
<i>Bacterias lácticas</i>	Enterobacterias
<i>Micrococos y Estafilococos</i>	Acromobacteriaceae
<i>Bacterias Esporuladas (Bacillaceae)</i>	Bacterias Gram Negativas diversas

Fuente: Buñay, Peralta; 2015

1.7.1. *Bacterias Gram Positivas*

Son de diferentes géneros, se distribuyen ampliamente en la naturaleza y se encuentran en el suelo, o en zonas donde existan altas concentraciones de proteínas, carbohidratos, vitaminas y poco oxígeno. Pueden soportar el pH 4 y tienen distintas formas desde bacilar hasta ovoide. Son anaerobias facultativas mesófitas y termófilas y su crecimiento es exigente. Pueden fermentar y producir ácido láctico y otros tipos de ácidos. (Sabena, 2009)

Las bacterias lácticas: estas bacterias pertenecen a la familia *Lactobacteriaceae* y son consideradas unas de las más importantes debido a la capacidad que tiene de fermentar lactosa para producir ácido láctico que es el responsable de que la leche se agrie. Las más importantes son: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* etc. (Buñay, Peralta, 2015)

Micrococco. Tienen poca actividad enzimática y son débiles fermentadores, por lo que son de poca importancia como agente adulterador de la leche. (Sabena, 2009)

Estafilococcos. Fuertes fermentadores, son aerobios facultativos de gran importancia ya que son los causantes de enfermedades como la mastitis, o de intoxicaciones en los humanos. El más importantes es el *Staphylococcus aureus* que es el responsable de producir una exotoxina que causa enfermedades intestinales en el ser humano, la cual es termo resistente por lo que no muere en la pasteurización. (Sabena, 2009)

Bacterias esporuladas: como los Bacillos son bacterias aerobias que tienen actividad enzimática variada, producen coagulación, acidificación y proteólisis. Entre las importantes está el *Clostridium* que son aerobios estrictos y producen gas. El *Clostridium botulinum* es capaz de producir toxinas patógenas, su crecimiento es inhibido por las bacterias lácticas por lo que son de poca importancia en leche cruda. Son resistentes a la pasteurización ya que sus esporas resisten temperaturas hasta los 100 °C (Buñay, Peralta, 2015)

1.7.2. *Bacterias Gram negativas*

Enterobacterias: los miembros de esta familia son los huéspedes normales del intestino de los mamíferos, por lo que su presencia en el agua como en la leche se relaciona directamente con las heces fecales. Estas bacterias son de gran importancia desde un punto de vista higiénico ya que varias de estas especies tiene poder patógeno y además producen sustancias viscosas y de sabor desagradable lo que va a conducir a una alteración de la leche. Las enterobacterias más comunes en la leche son: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella*, *Proteus*, *Brucella*, *Citrobacter*. (Sabena, 2009)

1.7.3. Requisitos Microbiológicos

Tabla 2.1: Requisitos microbiológicos de la leche cruda

Requisito	Límite máximo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos REP, UFC7cm ³	1,5x 10 ⁶
Recuento de células somática / cm ³	7,0 x 10 ⁵

Fuente: NTE INEN. Quinta revisión. 2008

1.7.4. Control de la leche antes y durante su proceso

La leche tiene en su composición una gran mezcla de nutrientes que son de gran valor en la industria. Por esta razón el control microbiológico y de sus componentes es de gran importancia para la calidad de la misma. Para ello se realizan una serie de pruebas desde que se receipta la leche hasta cuando es llevada a la planta procesadora. (Lucero, 2013)

Contaminación de la leche

1.7.5. Contaminantes biológicos

La leche puede ser contaminada de dos maneras:

Mamaria: es cuando los microorganismos alcanzan la ubre, y pueden contaminar la leche antes o después del proceso de ordeño. Dichos microorganismos pueden llegar a la leche por dos vías que son.

- **Ascendente:** cuando las bacterias se adhieren a la piel de la ubre y posteriormente al ordeño ya que están en el esfínter del pezón de la vaca. Las bacterias ascendentes más comunes están *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *coliformes* (Sabena, 2009)
- **Descendente:** son los microorganismo que tiene la capacidad de movilizarse de manera sistémica por la sangre y a través de los capilares mamarios llegando a afectar la ubre de la vaca. Las Bacterias más comunes por esta vía son: *Salmonella*, *Brucella*, *Mycobacterium tuberculosis*. (Sabena, 2009)

Medio externo. La contaminación se produce ya cuando la leche fue extraída de la glándula mamaria de la vaca. Las fuentes más comunes de contaminación son los tanques donde se almacena la leche, los utensilios, el transporte y las personas que son encargadas de manipular la leche. (Sabena, 2009)

Tabla 3.1: Fuentes externas de Contaminación de la leche cruda

Fuentes de Contaminación de la leche cruda	
Tipo	Causa
Animal	Se produce cuando el animal tiene cualquier lesión que puede contaminar, o la ubre se encuentra en contacto con el suelo o pastizales. Un ejemplo es la mastitis causada por la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> .
Aire	Se presenta en climas muy hostiles en donde hay cambios de temperatura, de humedad y radicación solar etc. Las bacterias que podemos encontrar son: <i>Micrococcus</i> , <i>Streptomyces</i> y <i>Aspergillus</i>
Agua	Que se usa para la limpieza de utensilios o equipos, también para la higiene del personal o del animal. Además encontrar microorganismos como <i>Pseudomonas</i> y bacterias <i>coliformes</i>
Suelo	Es la principal fuente de microorganismos termófilos y termodúricos.
Personal	Ocurre cuando el personal de ordeño no cumple con normas de higiene como lavarse las manos antes del ordeño o tocar la leche con las manos sucias. Aparecerán una serie de microorganismos patógenos.
Estiércol	Esta es la principal fuente de <i>coliformes</i> .
Transporte y utensilios	Se produce cuando no se tiene una higiene adecuada ni un proceso de desinfección eficaz, para conservar la calidad de la leche. La temperatura en el transporte también juega un papel fundamental en la conservación de la leche.

Fuente: Sabena; 2009

1.7.6. Contaminantes químicos

Derivan del medio que rodea a la leche desde su extracción de la glándula mamaria hasta su destino final. Los contaminantes químicos a los que se encuentra expuesto el bovino e indirectamente su leche pueden ser metales pesados, bifenilos polí clorados, furanos, dioxinas o hidrocarburos aromáticos polí clorados. También puede verse afectada con residuos farmacológicos originados de medicamentos veterinarios aplicados al animal, con restos de toxinas o plaguicidas presentes en el agua, pasto o pienso con que son alimentados. (INS, 2011)

Durante las etapas de ordeño, almacenamiento, transporte, distribución o comercialización la inocuidad de la leche se encuentra en riesgo por el uso de detergentes y desinfectantes en procesos de limpieza y desinfección al existir transferencia de los materiales en contacto con el alimento y por una posible adulteración con sustancias prohibidas por la regulación.

Medicamentos veterinarios: se administran al animal destinado a la producción de alimentos con fines terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o son útiles para cambiar funciones fisiológicas o de comportamiento. Dentro de este grupo suelen tener relevancia los residuos de antibióticos que se administran a los animales sin el necesario período de espera. La administración directamente a la glándula mamaria parece ser la vía más implicada en la presencia de residuos de antibióticos en la leche. Otros residuos farmacológicos hallados en la leche incluyen antiparasitarios, antiinflamatorios, promotores del crecimiento, ayudantes de producción, entre otros. (INS, 2011)

Plaguicidas: productos químicos empleados para combatir plagas que son vectores de enfermedades transmisibles o afectan las cosechas. Son considerados biosidas con algún grado de toxicidad para los seres humanos lo cual ha provocado preocupación debido al uso generalizado e indiscriminado de estos productos. (INS, 2011)

Contaminantes ambientales: dentro de esta categoría se encuentran los metales pesados, dioxinas, furanos, hidrocarburos aromáticos polí cíclicos y bifenilos polí clorados, que son de origen natural o el producto de actividades antropogénicas. Las concentraciones ambientales elevadas y su persistencia en el ambiente hacen que estos contaminantes lleguen a los pastos y a través de ellos a los animales, llegando al ser humano por medio de su dieta basada en productos lácteos. (INS, 2011)

Micotoxinas: los considerados metabolitos secundarios tóxicos producidos por determinados mohos que frecuentemente se presentan en la leche son las aflatoxinas, fumonisinas, zerealenona, tricoticonos y alcaloides. (INS, 2011)

La excreción de Micotoxinas en la leche es baja, presentándose cuando existen cambios en la barrera sangre-leche ya sea por infecciones sistémicas y locales o cuando la flora del rumen se afecta por enfermedades metabólicas, lo que permite el ingreso inesperado de toxinas no metabolizadas. (INS, 2011)

1.7.7. Adulterantes en Leche

Los principales adulterantes conocidos que son incorporados a la leche y que constituyen fraudes para el consumidor se dividen en dos grupos: los que se adicionan directamente como agua, sales neutralizantes diversas, sacarosa, glucosa y urea; y los que sustituyen a los constituyentes propios de la leche (proteínas y grasa) como suero de quesería y grasas de origen vegetal y animal. (Federación internacional de lechería, 2010)

La leche se considera genuina, y no adulterada, cuando, desde la producción hasta el consumo no se altera de forma voluntaria sus constituyentes naturales, ni se hacen manipulaciones destinadas a ocultar algún defecto de calidad.

El producto se considera genuino cuando ninguno de sus constituyentes naturales ha sido alterado deliberadamente o sometido a ninguna manipulación que enmascare defectos en su calidad en ningún momento durante la producción o comercialización del mismo. En este sentido, la leche debe estar libre de agua adicionada, materiales foráneos y el contenido de sus componentes tanto mayoritarios, como trazas debe estar dentro de los límites normales de su composición. (Federación internacional de lechería, 2010)

Adición de Agua.- Este es el tipo de adulteración más común por su mayor facilidad, que ocurre en la leche en el mundo y tiene como objetivo obvio incrementar las ganancias a partir del incremento en el volumen de ventas. La legislación y las regulaciones prohíbe expresamente la adición de agua a la leche, y por lo tanto, los procedimientos analíticos para detectar esta adición de agua tiene especial interés. (Federación internacional de lechería, 2010)

1.8. La leche y bacterias patógenas

La leche al poseer un alto valor biológico va a dar lugar a que una serie de bacterias y microorganismos puedan crecer en ella, los mismo que se multiplicaran rápidamente y hasta pueden competir entre ellos; de esta manera se puede poner en riesgo la calidad de la misma.

Sustancias como la lactosa que es un hidrato de carbono puede ser utilizado por los microorganismos sacarolíticos, las proteínas van hacer metabolizados fácilmente por microorganismos proteolíticos y por otro lado la grasa digerible que será metabolizada por los microorganismo lipolíticos. (González, 2003)

Entre las enfermedades más destacables que pueden afectar al hombre por consumo de leche cruda contaminada se encuentran:

Tabla 4.1: Enfermedades más destacables por consumo de leche cruda contaminada

Bacteria	Síntomas	Periodo
<i>Escherichia coli</i>	Diarreas, diarrea con sangre ,dolor y calambares abdominal, malestar	Los síntomas aparecen al 2 hasta 5 días después de haber ingerido el alimento, durando hasta 8 días.
<i>Salmonella</i>	Dolor de estómago, nauseas, escalofríos, diarreas, fiebre, dolor de cabeza	Usualmente se presenta de 8 a 24 horas de haber ingerido el alimento pero puede durar hasta 2 días.
<i>Clostridium botulinum</i>	Toxina que afecta al sistema nervioso, visión borrosa, parpados caídos, problemas al tragar y respirar.	Los síntomas aparecen de 18 a 36 horas, pero en ciertos casos pueden aparecer en 4 a 8 días de haber ingerido el alimento. Puede ser fatal de 3 a 10 días si no es tratada.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Calambres a nivel abdominal, diarreas, náuseas severas, vomito.	Aparecen de 1 a 6 horas de haber ingerido el alimento y la recuperación puede ir de 2 a 3 días.
<i>Shigella</i>	Diarreas con sangre y con mucosidad, calambres, fiebre, escalofrió, vómitos	Usualmente se presenta de 12 a 50 horas de haber ingerido el alimento pero puede durar pocos días o hasta dos semanas.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Escalofriaos, dolor de cabeza, dolor de espalda, fiebre, malestar a nivel	Puede tomar hasta 3 semanas para enfermarse, puede ser una enfermedad muy seria en personas de alto riesgo como

	abdominal, diarreas.	niños y mujeres embarazadas.
<i>Clostridium perfringens</i>	Diarreas y dolor causado por lo gases	Los síntomas aparecen de 8 a 24 horas de haber ingerido el alimento.

Fuente United States Department of Agriculture. (USDA, 2013)

Staphylococcus aureus

Tabla 5.1: Taxonomía del *Staphylococcus aureus*

Reino	Bacteria
Filo	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Bacillales</i>
Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
Genero	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>S. aureus</i>

Fuente: Buñay, Peralta; 2015

Es una bacteria anaerobio facultativa, Gram positiva, es también productora de catalasa, coagulasa, inmóvil y no esporulado, que está distribuida en todas las regiones del mundo, y se estima que cada una de tres persona posee esta bacteria, aunque no resultan afectadas por ella. (Castillo, 2013)

1.8.1.1. Patogenia

Esta bacteria es responsable de producir una enterotoxina termo resistente que puede causar estafiloenterotoxiosis o estafiloenterotoxemia. Se encuentra en las mucosas nasales, en la mucosa oral, en el pelo, ampollas y heridas por lo que el ser humano es su depósito natural. La contaminación de los alimentos se da debido a una mala higiene y a una mala manipulación de los mismos. (Anmat, 2008)

1.8.1.2. Características de la enfermedad

Los síntomas que pueden causar esta bacteria son de: vomito, cólico abdominal y postración, nauseas, sensación de angustia. En casos más severos puede venir acompañados de dolores de cabeza, arritmia cardiaca, dolores musculares y alteraciones en la presión sanguínea. (Anmat, 2008)

1.8.2. *Escherichia coli*

Tabla 6.1: Taxonomía de la *Escherichia coli*

Reino	Bacteria
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteria</i>
Orden	<i>Enterobacteriales</i>
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genero	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>E. coli</i>

Fuente: Buñay, Peralta; 2015

La *E. coli* se podría decir que es el microorganismo más estudiado por el ser humano. Es una enterobacteria que se encuentra por lo general en el intestino de los animales, en aguas negras, pero se puede encontrar en una serie de ambiente ya que es un organismo ubicuo. (Castillo, 2013)

Es un bacilo, Gram negativo, anaerobio facultativo, su movilidad es por medio de flagelos peritricos es decir que rodean su cuerpo, no forma esporas y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. Esta bacteria es necesaria para el funcionamiento adecuado del proceso digestivo. (Galli, 2012)

1.8.2.1. *Patogenia*

La *E. coli* es la productor de la toxina Shiga (STEC), la que se encuentra por lo general en los intestinos del animal, y llega a la superficie de la carne o de la leche por una contaminación con las heces fecales durante las faena, el ordeño o su posterior manipulación. Por lo que las persona se pueden contaminar con *E. coli* por comer o beber alimentos contaminados, o por contactos con animales o personas infectadas. (Anmat, 2008)

Esta bacteria es responsable de causar infecciones a nivel intestinal y extra intestinales tales como de la vías urinarias, aparato excretor, cistitis, peritonitis, uretritis, mastitis, septicemia y neumonía. (Galli, 2012)

1.8.2.2. Características de la enfermedad

Los síntomas que se presentan son dolores a nivel abdominal, diarrea, vomito, y en casos más graves diarrea sanguinolenta, trastornos de coagulación, deficiencias renales y hasta la muerte. Su periodo de incubación es de 3 a 9 días. (Anmat, 2008)

1.8.3. *Brucella abortus*

Tabla 7.1: Taxonomía de la *Brucella abortus*

Reino	Bacteria
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Proteobacteria alfa</i>
Orden	<i>Rhizobiales</i>
Familia	<i>Brucellaceae</i>
Genero	<i>Brucella</i>
Especie	<i>B. abortus</i>

Fuente: Buñay, Peralta; 2015

La *Brucella* es una bacteria Gram negativa, son cocobacilos, flagelado, intracelulares facultativos, que carecen de capsula y no que no forman esporas. Es conocida por producir una zoonosis, la enfermedad de la brucelosis. (Ryan, 2004).

La característica de esta enfermedad es el aborto, que se puede transmitir por la ingesta de Organismos *B. abortus* que se encuentran en membrana fetales, y fluidos uterinos o por agua o alientos contaminados. (M Ortega, S Valdezate, 2013)

1.8.3.1. Patogenia

El contagio de esta enfermedad se da por el contacto directo con fluidos (orina, heces, fetos abortados, placenta, sangre) de algún animal que está infectado o también por el consumo de productos que provienen del animal infecto, principalmente la leche cruda y otros productos que

son elaborados a base de la misma. La bacteria después de la ingesta y haber establecido contacto con el individuo va a enterar en el organismo por la boca, nariz ojos o zonas lesionadas como heridas o cortes. (Dudzinska, 2015)

1.8.3.2. Características de la Enfermedad

Los síntomas que se presentan son dolor abdominal, acompañados de escalofríos, fiebre, fatiga, sudoración, dolor de articulaciones y espalda, dolor de cabeza pérdida de peso y debilidad. El periodo de incubación es de seis semanas pero puede extenderse por varios meses. (Reyes, Villaroel, 2006)

1.9. Uso de antibióticos en ganadería lechera

Los propósitos por los que se administran antibióticos en vacas productoras de leche son:

1. Tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por diversos microorganismos entre las que se menciona a aquellas que afectan a las mamas, infecciones pódalas, pulmonía, podofilitis, entre otras.
2. Prevención de enfermedades infecciosas al incluir fármacos antibacterianos en el alimento del bovino.
3. Estimulantes del crecimiento, empleándose concentraciones subterapéuticas por un período prolongado con el fin de mejorar la conversión del alimento o promover el crecimiento del animal. (Bogio, 2010)

Los antibióticos empleados con mayor frecuencia en la ganadería lechera bovina pertenecen a los siguientes grupos: betalactámicos dentro del cual está la penicilina que constituye el tratamiento obligado en numerosas enfermedades infecciosas; tetraciclinas; oxitetraciclinas; sulfas; amino glucósidos como la neomicina y macrólidos como la Eritromicina. (Bogio, 2010)

Tabla 8-1: Límites máximos residuales (LMR) de antimicrobianos en leche

Antimicrobiano	LMR (ug/kg)
Amoxicilina	4
Ampicilina	4
Bacitracina	100

Bencilpenicilina	4
Ceptiofur	100
Colistín	50
Eritromicina	40
Espectinomisina	200
Espiramicina	200
Dihidroestreptomicina/ Estreptomicina	200
Gentamicina	100
Kanamicina	150
Lincomicina	150
Neomicina	1500
Penicilina G sódica	5
Pirlimicina	100
Sulfadimidina	25
Tetraciclina	100
Tilosina	100
Oxitetraciclina	100

Fuente: Comisión del Codex Alimentarius, 2012; Unión Europea, 2010

1.10. Residuos de Medicamentos Veterinarios

1.10.1. Contaminación de la Leche por Antibióticos

En los mamíferos la leche constituye una vía natural de eliminación para estas sustancias y sus metabolitos durante un periodo variable de tiempo que depende tanto del animal tratado (especie, raza, edad, estado fisiológico) como también del medicamento utilizado. (Balbero, 2011)

La cantidad de antibióticos que llega a la leche depende del tipo de preparado (componente activo y vehículo), dosis y forma de aplicación, producción de leche del animal tratado, tipo y grado de afección mamaria y tiempo que media entre el tratamiento y el ordeño. (Magariños, 2008)

Tabla 9.1: Tiempo medio de permanencia en diferentes partes de aplicación de diferentes antibióticos (Balbero, 2011)

ADMINISTRACION	PERMAEMCIA
Oral	86 horas
Intramuscular	72 - 96 horas
Intravenosa	44 horas
Intramamaria	48 - 144 horas
Intrauterina	31 horas

Fuente: Abril, Pillco; 2013

La administración ya sea oral, intramuscular o intravenosa, tiene menos importancia, desde el punto de vista de higiene de leche, que la aplicación por vía intra mamaria. Esta última es la más usada para el tratamiento de la mastitis, dependiendo la cantidad de antibióticos eliminada por la leche del tipo de preparado, dosis, intervalos entre tratamiento y ordeño, número de ordeños, producción de leche y factores individuales. Los preparados con base hidrófoba, presentan un tiempo de eliminación más prolongado que aquellos con base acuosa. (Magariños, 2008)

Debido a que los antibióticos de aplicación intramamaria son de fácil aplicación y generalmente baratos, dado que usualmente no se consulta al médico veterinario para su aplicación, se han hecho muy populares en las explotaciones lecheras y la consecuencia inmediata de esto es su reconocimiento como la principal causa de aparición de residuos de antibióticos en la leche. (Magariños, 2008)

1.10.2. Mecanismos de Resistencia antimicrobiana

Existe una serie en la que los me microorganismos son capaces de resistir a los agentes antimicrobianos. Entre ellos están:

1. La bacterias tiene la capacidad de producir enzimas que van a destruir en agente antimicrobiano antes que puede alcanzar el blanco y ejercer su actividad, o modifica al agente antimicrobiano de tal forma que no puede ser identificado por el blanco.
2. La pared celular de las bacterias vuelve impermeable al agente antimicrobiano
3. Por medio de una mutación el sitio de ataque es alterado y ya no va a permitir la unión del agente antimicrobiano
4. La bacteria tiene una bomba de flujo que aleja al agente antimicrobiano antes de que pueda alcanzar su blanco.

5. Las rutas metabólicas que se ubican en la parte interior de la bacteria son modificadas genéticamente, para que de esta forma el agente antimicrobiano no pueda ejercer su efecto. (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

1.10.3. Resistencia Intrínseca VS. Adquirida

En algunas especies la resistencia antimicrobiana es una de las propiedades que son innatas de ellas o intrínsecas. Esto dependerá de las características propias de la bacteria y de los mecanismos de resistencia. (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

Las bacterias pueden adquirir resistencia a los antimicrobianos por diferentes eventos genéticos como lo son: mutación, transformación, transposición, transducción y conjugación. (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

Mutación: es el resultado de una mutación espontánea en un locus que controla la susceptibilidad a cierto agente antimicrobiano. Ocurre con una frecuencia aparentemente baja, pero al ser expuestas a los antimicrobianos solo las células que desarrollaron la mutación sobreviven, las mismas que se multiplican y dan origen a una población de células resistente. (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

Conjugación: Las bacterias contienen dentro de sus elementos genéticos a los plásmidos, muchos de ellos contienen genes de resistencia antimicrobiana. Cuando dos bacterias están juntas se puede formar un pilus que es una especie de puente, el que va a permitir que una copia de un plásmido se replique y sea transferida entre las dos células de la una a la otra. (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

Transformación: Las bacterias pueden encontrar fragmentos de ADN desnudo que pueden contener genes de resistencia antimicrobiana. El fragmento de ADN se incorpora en el cromosoma de la nueva célula huésped por recombinación dando así como resultado una nueva célula resistente. A este proceso se lo llama transformación. (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

Transducción: cuando los bacteriófagos o virus bacterianos están multiplicados en el citoplasma de la bacteria, fragmentos de ADN, cromosomas, o plásmidos, pueden empacarse por casualidad en un capsula viral y de esta manera entrar en otra célula huésped. De esta forma si alguno de estos fragmentos contiene genes de resistencia estos se traspasan a la nueva célula huésped. (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

Transposición: los transposones son secuencias especiales de cromosomas “móviles” que tienen la capacidad de moverse entre cromosomas, ADN o plásmidos del bacteriófago. De esta manera transposones de ADN pueden estar incorporados a plásmido y así contener genes de resistencia. (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

1.10.4. Importancia en la Salud Pública

No se conocen informes sobre intoxicaciones provocadas por antibióticos de uso común ingeridos a través de la leche y se explica porque sus concentraciones resultan ser muy bajas como para provocar un efecto tóxico, con la excepción, Posiblemente, del cloranfenicol, que es capaz de producir, de acuerdo a algunos investigadores, anemia aplásica por depresión de la médula ósea, al suministrarse dosis bajas por períodos cortos de tiempo. No obstante lo anterior, subsiste la duda de si el consumo de antibióticos por el hombre, a través de alimentos contaminados, puede alcanzar niveles que determinen una toxicidad de tipo crónico, motivo más que suficiente para prohibir la presencia de éstos en los alimentos. (Magariños, 2008)

Otro de los problemas que ocasiona en el ser humano el antibiótico presente en la leche, lo constituyen las reacciones de tipo alérgico que se producen luego de un período de sensibilización, en el cual se generan en el sistema retículo endotelial anticuerpos contra la droga administrada que actúa como antígeno. El contacto con los antígenos, continuado o periódico, provoca la reacción alérgica que resulta desproporcionada con la dosis ingerida. (Magariños, 2008)

En la alergia humana producida por antibióticos contenidos en la leche se dan efectos bien establecidos, sobre todo para los antibióticos de tipo β -lactámico. Estos efectos son reacciones alérgicas comprendido entre un espectro que va desde salpullidos superficiales apacibles hasta angiodema e inclusive anafilaxis. Las consecuencias sobre la salud son más graves en aquellos sectores de la población más débiles, como son las poblaciones anciana e infantil ambas tradicionalmente consumidoras de productos lácteos. (Balbero, 2011)

La OMS establece que para el caso de administración oral de 40 UI de penicilina, esta dosis puede provocar graves reacciones, lo que permite suponer que no deberían permitirse la presencia de cantidades trazas en la leche. (Balbero, 2011)

Además del problema de las reacciones alérgicas, los antibióticos presentes en la leche pueden provocar los siguientes efectos en el consumidor:

- Alteración de la microbiota intestinal

- Estimulación de bacterias antibiótico-resistentes
- Desarrollo de microorganismos patógenos, y
- Reducción de la síntesis de vitaminas. (Magariños, 2008)

1.11. Métodos de identificación y confirmación de la presencia microorganismos indicadores en la leche cruda

1.11.1. Placas Petrifilm

1.11.1.1. Recuento de microorganismos en placas Petrifilm

El uso de las placas Petrifilm, es un método muy usado en la actualidad para realiza pruebas microbiológicas rápidas, avalado poa la AOAC internacional para el recuento de bacterias, presentando como ventaja importante que no se requiere de una preparación media del medio de cultivo, lo que va a reducir costos y un ahorro de tiempo, teniendo la misma efectividad y confiabilidad de los resultados que se vayan a obtener. (Buñay, Peralta, 2015)

1.11.1.2. Que son las placas Petrifilm.

Consisten en láminas delgadas con medio de cultivo y con un agente solidificante soluble en agua, además que pueden estar recubiertas por una lámina de polipropileno con la finalidad de atraer el gas que pueden producir ciertas bacterias. También en su composición tienen indicadores de pH que van a colorear a las colonias de bacterias para que sea más fácil su identificación, y así una cuadrícula que nos servirá para el recuento UFC (unidades formadoras de colonia). (Buñay, Peralta, 2015)

Además poseen un componente que les permite gelificar en frio, el medio se rehidratara una vez que se coloque el sustrato que se va analizar, para esto se requiere un pH de la muestra de 6.5 y 7.2 ya que el tinte de coloración de colonias reacciona eficazmente a un pH neutro. (Buñay, Peralta, 2015)

1.11.1.3. Placa petrifilm para Recuento de Staphylococcus aureus

Este sistema de recuento en placa consiste en una placa y un disco Petrifilm Staph Express, la que contienen un sistema de medio de cultivo preparado. El medio de esta placa es el medio Cromogénicos de Baird-Parker que es selectivo y diferencial para *Staphylococcus aureus*, que va a producir colias de una coloración rojo- violeta en la placa, colonias que no presenten este color no serán de esta bacteria. (Alonso, 2008)

1.11.1.4. Placa Petrifilm para recuento de *Escherichia coli*/ Coliformes

La placa para el recuento de *Escherichia coli*/ Coliformes, contiene nutrientes del medio VRBG, el indicador 5-bromo-4-cloro-3-indolilbeta- D- glucorónico (BCIG) y un agente gelificante que es soluble en agua fría. Tiene una lámina de papel con una cuadrícula impresa que está recubierta por polopropileno, en la parte superior contiene otra lamina de polipropileno que contiene gel soluble en agua fría y tricloruro de trifeniltetrazolio (TCC) como indicador. (Alonso, 2008)

La mayoría de las *E. coli* produce beta-glucuronidasa, la que va a producir un precipitado azul asociado con la colonia. A su vez la película que se encuentra en la parte superior de la placa se va encargar de atrapar el gas que se produce por la fermentación de la lactosa por parte de estos dos microorganismos. Un 95 % de *E. coli* producen gas lo que va a ser representadas por colonias de coloración azul y rojo-azules que son asociadas al gas que fue atrapado, mientras que por otro lado las colonias de color rojo son las de los Coliformes que son asociadas a burbujas de gas. Las placas se deben incubar a 48 ± 2 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ en lácteos. (Alonso, 2008)

1.11.2. MicrogenTM GN-ID Identificación

1.11.2.1. Uso

El sistema Microgen GN-ID utiliza 12 (GN A) o 24 (GN A+B) substratos bioquímicos estandarizados en pocillos para identificar la familia Enterobacteriaceae y otros bacilos no-exigentes Gram. Negativos (oxidasa negativos y positivos). El kit se ha diseñado solo para uso profesional. (MicrogenTM, 2004)

1.11.2.2. Principio gel Test

El sistema Microgen GN-ID comprende dos tiras de micropocillos por separado (GN A y GN B). Cada tira contiene 12 sustratos bioquímicos estandarizados que han sido seleccionados en función de un análisis informático muy extenso de las bases de datos publicadas para la identificación de la familia Enterobacteriaceae y los microorganismos Gram. Negativos oxidasa positivos y negativos no exigentes más comunes. Los sustratos deshidratados en cada pocillo se reconstituyen con una suspensión salina del organismo a identificar. Si los sustratos son metabolizados por el organismo, se observará un cambio de color durante la incubación o después de la adición de reactivos específicos. La permutación de los sustratos metabolizados se puede interpretar usando el Software Microgen Identification (MID-60) para identificar el organismo analizado. (MicrogenTM, 2004)

Las tiras de GN A han sido diseñadas para la identificación de fermentadores de glucosa oxidasa negativos, nitrato positivas que incluyen los géneros más comunes de la familia Enterobacteriaceae. Las tiras GN A y GN B se utilizarán conjuntamente obteniendo un sistema con 24 sustratos para identificar bacilos Gram. Negativos no-exigentes (oxidasa negativos y positivos) además de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae (28 géneros).

Las tiras de GN B han sido diseñadas para ser usadas conjuntamente con las tiras GN A y no de modo individual (MicrogenTM, 2004)

1.11.3. Tinción de Gram

Es la técnica más utilizada para el examen microscópico de las bacterias, permitiendo clasificar en dos grupos: bacterias Gram positivas capaces de retener el colorante cristal violeta después de un proceso de decoloración con alcohol o éter-acetona y observándose al microscopio bacterias de color violeta o azul oscuro y el segundo grupo corresponde a bacterias Gram negativas que se decoloran y contratiñen con safranina por lo tanto al observarlas al microscopio presentan un color rosado. (Scott, Bailey, 2009)

1.11.4. Prueba de la Catalasa

Se utiliza para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La principal excepción es *Streptococcus*. (Sanchez, 2008)

1.11.5. Prueba de la Oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo, pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. (Mediaumh, 2013)

1.11.6. Agar Mueller Hinton

Se utiliza en el procedimiento de difusión en disco estandarizado para la determinación de la sensibilidad de cepas aisladas a partir de muestras clínicas, de organismos aerobios de rápido crecimiento ante agentes antimicrobianos, conforme a las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (BD, 2013)

La composición del medio Mueller Hinton permite el crecimiento de las bacterias no exigentes (enterobacterias, bacilos Gram-negativos no fermentadores, estafilococos y enterococos) encontrados en patología humana, mientras que garantiza mínimas interferencias entre los componentes del medio y el resultado de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. (BD, 2013)

1.11.7. Suplemento selectivo para Brucella

Este suplente se agrega al agar para que exista un crecimiento exclusivo de *Brucella* y no de otras bacterias. Un frasco de suplemento selectivo conteniendo los siguientes antibióticos: Polimixina B, 2,500 U.I; Bacitracina, 12,500 UI; Ciclohexiimida, 50mg, Acido Nalidíxico, 2.5 mg, Nistatina, 50,000 UI y Vancomicina 10mg. (Lugo. A, 2010)

1.11.8. Agar Cerebro-Corazón

Es un medio de uso general adecuado para el cultivo de una amplia variedad de tipos de organismos, incluidos las bacterias, levaduras y hongos filamentosos, a partir de muestras clínicas. (BD, 2013)

1.11.9. Agar Eosina azul de metileno (EMB)

Método diferencial selectivo desarrollado por Levine para el aislamiento e identificación de bacterias Gram negativas fermentadoras de lactosa como son las Enterobacterias, puesto que sus colorantes inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas. Las bacterias que crecen muestran un color violeta más o menos intenso y en el caso de *Escherichia coli* aparece violeta como indicador de lactosa positiva pero con un brillo verde metálico que facilita su detección. (Prast, 2005)

1.11.10. Agar Manitol Salado

Medio altamente selectivo para el aislamiento de estafilococos patógenos en donde las bacterias poseen la capacidad de desarrollarse en presencia de cloruro de sodio al 7.5% y en el caso de la especie *Staphylococcus aureus* fermentar manitol al cambiar de color el indicador rojo fenol presente en el agar y formar un halo amarillo en el medio circundante que es indicativo de producción de ácido a partir de manitol. (BD, 2013)

1.12. El Antibiograma

1.12.1. Para que se realiza un antibiograma

Uno de los principales objetivos del antibiograma es el de medir la sensibilidad de una sepa bacteriana que se tiene la sospecha que es la causante de alguna infección a uno o un grupo de antibióticos. La sensibilidad que una bacteria presenta in vitro es uno de los requisitos para que el tratamiento in vivo con antibióticos sea eficaz. El antibiograma sirve como una herramienta para orientar a las decisiones terapéuticas. (Val, 2008)

Otro objetivo del antibiograma es de proporcionar un seguimiento epidemiológico de la evolución de las resistencias bacterianas a los antibióticos. Gracias a esto se puede adaptar una antibioterapia empírica, se puede revisar los espectros clínicos de los antibióticos de una forma periódica y de esta forma adoptar decisiones sanitarias como la creación de programas de prevención en centros de salud. (Val, 2008)

1.12.2. Sensibilidad bacteriana a los antibióticos

La base de medida de la sensibilidad que tiene una bacteria a un cierto antibiótico está dada por la CIM que significa la determinación de la Concentración Inhibidora Mínima. Podemos definir la CIM como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca la inhibición de cualquier tipo de crecimiento bacteriano visible. Este valor es la principal referencia que tenemos para establecer una escala de la actividad del antibiótico ante las distintas especies de bacterias que existen. (Val, 2008)

Existen varios métodos ya sean manuales o automatizados que nos permiten medir o calcular la sensibilidad de una sepa bacteriana frente a un antibiótico, de esta forma podemos categorizar de la siguiente manera: la cepa se denomina Sensible (S), Intermedia (I) o Resistente (R) al antibiótico. (Val, 2008)

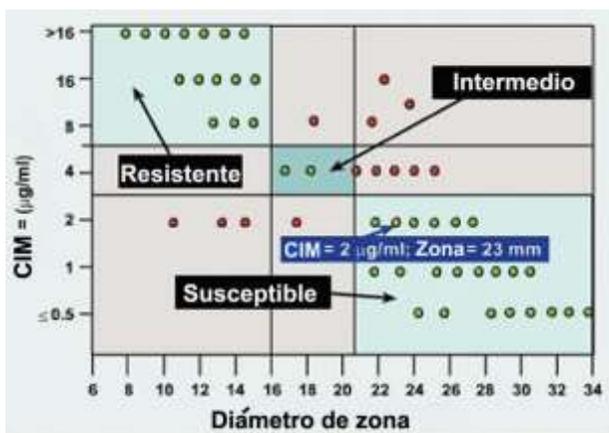


Figura 1.1: Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana
Fuente: Cavalleri, J. et al, 2005

Para un tipo de antibiótico, una cepa de alguna bacteria es, según la NCCLS (2012):

Tabla 10.1: Sensibilidad bacteriana a los antibióticos

Categoría	Probabilidad terapéutica
Sensible	Una buena probabilidad de éxito terapéutico, en caso de un tratamiento habitual
Resistente	La probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy escasa. No se puede esperar ningún efecto terapéutico con el tratamiento
Intermedia	El éxito terapéutico es impredecible. Se

	<p>puedo conseguir un buen tratamiento terapéutico con concentraciones como cambios en la posología o aumento de las concentraciones.</p>
--	---

Fuente Clinical & Laboratory Standards Institute, 2012

1.12.3. Descripción de los discos de antibióticos

Los discos empleados son de papel estéril absorbente y contienen concentraciones precisas de los agentes antimicrobianos. Presentan un tamaño de 6.5 mm y se encuentran identificados por medio de un código que comprende de 1 a 3 letras a ambas caras del disco. (Alvarez, 1995)

1.12.3.1. Penicilina G

Pertenece al grupo de betalactámicos y se utiliza para investigar la susceptibilidad de todas las penicilinas penicilinas-sensible, es decir que sus resultados son aplicables a fenoximetilpenicilina, fenoxietilpenicilina (feneticilina) y fenoxipropilpenicilina (propicilina). (Alvarez, 1995)

El fármaco está indicado para tratar infecciones de los bovinos por agentes sensibles a penicilina como *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Actinomyces spp.* Por lo tanto se lo recomienda en caso de mastitis, procesos piógenos, edema maligno, pielonefritis, hemoglobinuria bacilar, listeriosis, actinomicosis, tétano y estreptococosis .La penicilina G Potásica o benzilpenicilina potásica tiene como características principales su farmacocinética la cual actúan inhibiendo la síntesis de mucopéptido en la pared celular, haciendo a la bacteria permeable e inestable. (Veterinaria, 2012)

1.12.3.2. Eritromicina

Antibiótico representante de los macrólidos usado en situaciones en las que existe alergia a penicilina y únicamente se aplica en antibiogramas de bacterias Gram positivas. .Es bacteriostático y en altas concentraciones puede ser bactericida. (Veterinaria, 2012)

Actividad contra Gram positivos, *estafilococos*, *estretococos*, y bacilos como *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Listeria* y bacilos *antracis*. Bacilos Gram negativos susceptibles incluyen *Pasteurella* y *Brucella*. (Veterinaria, 2012)

Se prescribe para tratar infecciones del tracto respiratorio como coriza, sinusitis infecciosa, sinovitis y enteritis específica en ganado porcino, bovino, perros y gatos. (Ecured, 2016)

1.12.3.3. Tetraciclina

Sirve para investigar todos los derivados del grupo al ser sus resultados aplicables a clortetraciclina, demeclocina, doxiciclina, metaciclina, oxitetraciclina, minociclina y rolitetraciclina. (Alvarez, 1995)

Posee un amplio espectro de actividad frente a bacterias sensibles Gram positivas, Gram negativas, micoplasmas y espiroquetas. Han demostrado resistencias *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus*, *Estafilococos* y Vibriones.

Se recomienda en bovinos para el tratamiento de enfermedades respiratorias, difteria, enteritis bacteriana, heridas infectadas, metritis aguda, mastitis septicémicas, dematofilosis y en infecciones no específicas o bacterias secundarias. (Rodríguez, 1998)

1.12.3.4. Clindamicina

Derivado clorado de lincomicina que presenta acción bacteriostática contra *Staphylococcus spp.*, *Campylobacter spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Clostridium perfringens* y *Actinomyces spp.*

Indicado para tratar infecciones del tracto respiratorio, actinomicosis, mastitis y enteritis provocada por *E. coli*. (PEV, 2016)

1.12.3.5. Ciprofloxacino

Antibiótico empleado en infecciones que afecten al sistema respiratorio, gastrointestinal o urogenital. Muy efectivo para *Mycoplasma spp.*, *Pasteurella spp.*, *Actinobacillus Pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus spp.* (Bio-Vet, 2001)

1.12.3.6. Cefoxitin

Cefalosporina de segunda generación con mayor espectro de acción frente a gérmenes Gram negativos sobre todo de *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, y *Proteus spp.*, que sus homólogas de primera generación. Es usada en casos de mastitis e infecciones provocadas por anaerobios. (Castillo y De la Cruz, 2012; Valdovinos y Fabela)

1.12.3.7. Ampicilina

Derivado semisintético del núcleo de la penicilina con amplio espectro, gran capacidad antibacteriana y mayor actividad sobre las bacterias resistentes a los betalactámicos. Es útil para probar hetacilina, amoxicilina, pivampicilina, bacampicilina, talampicilina y metampicilina. (Alvarez, 1995)

Es espectro de acción de la ampicilina comprende Gram positivos y Gram negativos aerobios incluyendo cepas de *E coli*, *Klebsiella* y *Haemophilus*. También son susceptibles algunos anaerobios incluyendo algunas especies de *Clostridium*. (Veterinaria, 2012)

1.12.3.8. Estreptomicina

Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis bacteriana.

Utilizada regularmente en formulaciones con penicilina. La estreptomicina posee un espectro de acción contra Gram negativos y la sinergia con el betalactámico le brinda un amplio espectro. Eficaz contra especies de *Campylobacter*. Se utiliza en conjunto con tetraciclinas para el tratamiento contra *Brucella abortus* en el estado de portador. (Veterinaria, 2012)

1.12.3.9. Gentamicina

Para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos sensibles a la gentamicina (del aparato genito-urinario, respiratorio, gastrointestinal). Útil además en casos de mastitis, metritis bacteriana, infecciones cutáneas y posoperatorias, septicemias, entre otras. Medicamento eficaz frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Serratia marcescens.*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus.* (Agrovetmarket, 2014)

1.12.3.10. Kanamicina

Fármaco útil para tratar infecciones provocadas por *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinobacter*. No es un antibiótico de elección para infecciones a causa de estafilococos pero podría utilizarse en ciertas situaciones cuando la infección se origina por un estafilococo conocido o sospechoso. (Bio-Vet, 2001)

1.12.3.11. Nitrofurantoína

Es un antiséptico urinario que se utiliza en infecciones urinarias por Gram (+) y algunos Gram (-).

Actúan principalmente contra bacterias Gram negativas, como: *E. coli*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Arizona hinshawii*, *Vibrio coli*, *Shigella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, y *Corynebacterium spp.* (Veterinaria, 2012)

1.12.3.12. Amikacina

Derivada de la Kanamicina., su actividad principal contra bacilos aerobios Gram-negativos. Las Bacterias susceptibles: *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*. Indicada en infecciones renales y de vías urinarias, infecciones respiratorias, infecciones oticas causadas por Gram negativas. En general se recomienda no mezclar con antibióticos Beta-lactamico y suele emplearse cuando existe resistencia a la gentamicina. (Veterinaria, 2012)

CAPITULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Lugar de la investigación

Las muestras de leche cruda se recolectaron en el la Empresa de Lácteos “La Herencia” en San Andrés y en La empresa de lácteos “Santa Fe” en Tunshi.

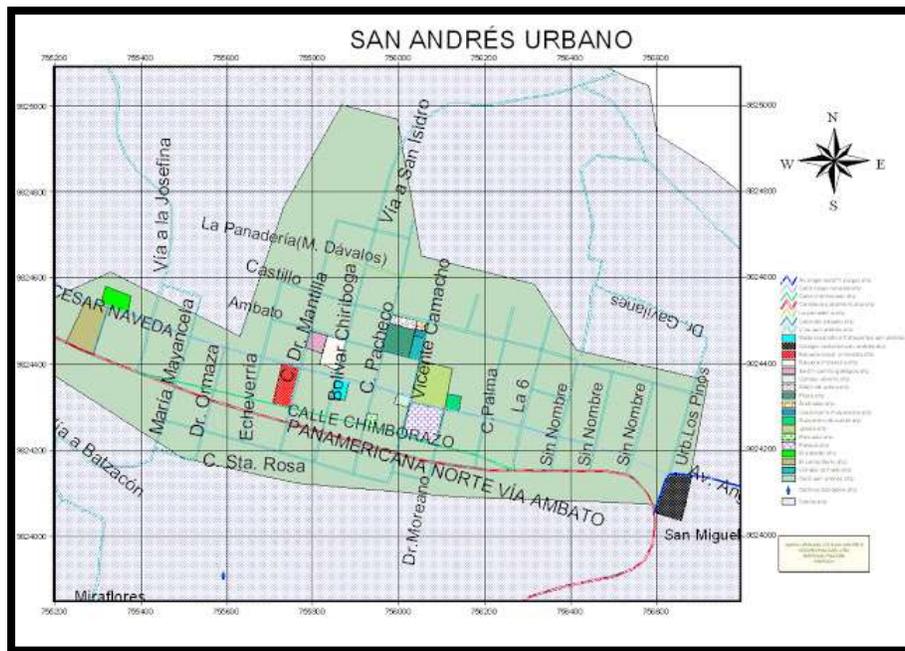


Figura 1.2: Mapa de la ubicación de San Andrés

Fuentes: Bayardo; 2013

2.2. Factores de estudio

2.2.1. Población

Leche cruda comercializada en las Empresas de Lácteos de Tunshi y San Andrés

2.2.2. Muestra

Las muestras seleccionadas fueron tomadas de la leche cruda que nos provee las empresas de lácteos Santa Fe ubicada en Tunshi y La Herencia en San Andres respectivamente, las mismas que solo tuvieron un análisis sensorial y pruebas físico – químicas básicas.

En esta investigación el tamaño de la muestra se la determinara mediante un muestreo aleatorio simple hasta obtener un equivalente de 3 muestras de 200 ml de leche cruda por cada empresa de Lácteos, en este caso tendríamos 3 muestras de 200ml de la empresa de lácteos Santa Fe y otras 3 muestras de 200ml cada una de la empresa de lácteos La Herencia en San Andrés; las cuales serán tomadas una vez semanalmente por un lapso de 3 semanas para concluir con el muestreo.

2.3. Materiales, Equipos y Reactivos

Materiales

- Cofia, mascarilla, guantes y mandil
- Cava refrigerante
- Gel refrigerante
- Frascos de vidrio estériles con tapa rosca
- Marcador permanente
- Puntas azules estériles
- Pipeta automática de 1000 µl
- Tubos de ensayo estériles
- Gradilla
- Placas Petrifilm 3M para recuento de *Coliformes totales* y *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.
- Dispensor para placas Petrifilm
- Probeta
- Balones de aforo
- Matraces Erlenmeyer
- Reverbero
- Lámpara de alcohol
- Cinta indicadora de esterilización
- Franela
- Toallas absorbentes

- Algodón
- Tubos de vidrio estériles
- Tubos Durham
- Cajas Petri
- Hisopos estériles
- Asa y aguja de inoculación
- Placas portaobjetos
- Discos de antibióticos
- Pinza para discos
- Agua peptonada
- Alcohol Potable
- Alcohol Industrial
- Agar Cerebro-Corazón
- Suplemento selectivo para el aislamiento de Brucella
- Agar Mueller Hinton
- Estándar McFarland
- Solución salina estéril
- Regla

Equipos

- Balanza
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa bacteriológica
- Refrigerador
- Microscopio

Reactivos

- Agua destilada
- Aceite de inmersión
- Kit para tinción Gram: cristal violeta, lugol, acetona y safranina
- Kit Microgen™ GN-ID Identificación

2.4. Metodología

2.4.1. Recolección y transporte de muestras

La recolección y transporte de las muestras se llevó a cabo de acuerdo a la Norma INEN 0004: Leche y productos lácteos. Muestreo.

Para la recolección de las muestras se acudió la Empresa de Lácteos “La Herencia” en San Andrés y en La empresa de lácteos “Santa Fe” en Tunshi a las 7:00 de la mañana, recogiendo de cada empresa tres muestras de un litro distintos proveedores, identificándolas y transportándole en un cooler con gel refrigerante al Laboratorio de Análisis Bioquímico y Bacteriológico de la ESPOCH, sitio en el cual se procedió inmediatamente a colocar cada litro de leche en frascos de vidrio estériles con tapa rosca de plástico y debidamente identificados; esta actividad se realizó en la cámara de flujo laminar.

2.4.2. Preparación de la suspensión inicial y diluciones

- 1) Se homogenizo la leche cruda agitando 25 veces el frasco que contiene la leche cruda durante 10 segundos.
- 2) Se tomo 10 ml de la leche y colocamos en un frasco estéril de menor volumen.
- 3) Agregamos 90 mL del diluyente agua peptonada al 0.01% y mezclamos correctamente. Obteniéndose la primera dilución (10^{-1}).
- 4) Se transfirió con pipeta automática 1 mL de la solución a un tubo de ensayo estéril que contenga 9mL de agua peptonada y procedimos a homogenizar, resultando así la dilución 10^{-2} .
- 5) Se coloco 1 mL de la segunda dilución y colocamos en un segundo tubo e igualmente agregar 9 mL de agua peptonada, obteniéndose la tercera dilución (10^{-3}).
- 6) Se procedio de la manera expuesta en el paso anterior para obtener la tercera dilución con la cual se procedió a trabajar. (NTE INEN.1529-2, 1999)

2.4.3. Recuento de *Staphylococcus aureus* por la técnica de Petrifilm según 3M

Se preparara la muestra y las diluciones de los homogenizados.

- Se colocó la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada y se levantó la película superior.

- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formaran burbujas.
- Se colocó suavemente el dispensador plástico correspondiente sobre la lámina superior, cubriendo el inóculo.
- Se levantó el dispensador y se esperó aproximadamente dos minutos para que se solidifique el gel.
- Se incubó las placas boca arriba en grupos de máximo 20 placas a $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.
- Posteriormente se observó la aparición de colonias de color rojo-violeta, en caso de que se presentaran colonias de otra tonalidad, se insertó el disco de confirmación por DNAsa Staph Express.
- Se incubó nuevamente las placas a 35°C durante 1-3 horas
- Se realizó el recuento de colonias que presentaran zonas rosadas como pertenecientes a *S. aureus*
- Se realizó el reporte en unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro. Teniendo en cuenta el factor de dilución. (Alonso, 2008)

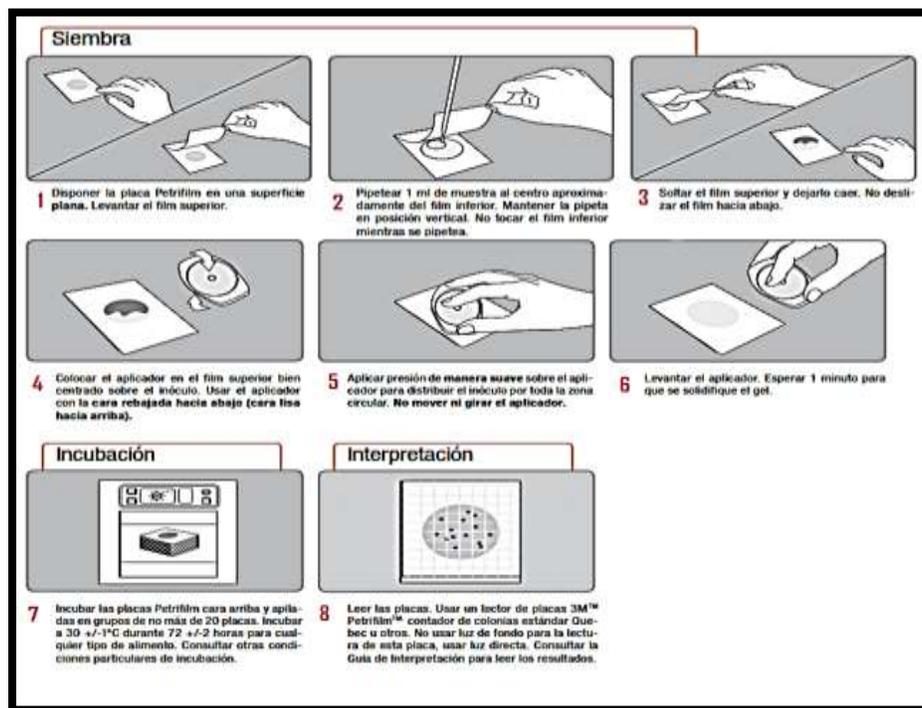


Figura 2.2: Siembra, incubación e interpretación de las placas Petrifilm

Fuente: 3M™PETRIFILM™, 2003

2.4.4. Recuento *E. coli*/ Coliformes por la técnica de Petrifilm según 3M

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada y se levantó la película superior.
- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formaran burbujas.
- Se colocó suavemente el dispersor plástico correspondiente sobre la lámina superior, cubriendo el inóculo.
- Se levantó el dispersor y se esperó aproximadamente dos minutos para que se solidifique el gel.
- Se incubó las placas boca arriba en grupos de máximo 20 placas a 35°+/-2°C durante 24 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia que presentaron color azul con presencia de gas.
- Se realizó el reporte en unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución (Alonso, 2008)

2.4.5. Recuento *Brucella*

2.4.5.1. Preparación del medio:

1. Preparar Agar Cerebro-Corazón:

- Se suspendió los gramos respectivos de polvo en la cantidad de agua purificada que se requiera (37g en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad de placas a preparar.
- Se calentó con agitación frecuente y hervimos hasta que se disuelva totalmente y mandar a la autoclave por 30 minutos para que se esterilice.

2. Preparación del suplemento para *Brucella*

Al Suplemento selectivo para el aislamiento de *Brucella* se le reconstituyó con agua destilada estéril, hasta que se logró que todo el polvo se disuelva, y después lo pasamos por un filtro Millex de 0.22 um con ayuda de una jeringa, para que no existiera ninguna irregularidad en el reconstituido. (Villaroel, M.; Grell, M. y Saenz, R., 2010)

- En los 500 ml de Agar cerebro corazón preparados, se dejó enfriar a una temperatura aproximadamente de 50°C, y se procedió a añadir Suplemento selectivo para el aislamiento de *Brucella*.

Así se distribuyó en las placas Petri estériles, en volumen apropiado aproximadamente 4mm sobre una superficie horizontal.

2.4.5.2. Siembra:

- Con la ayuda de una aza estéril se tomó la colonia que deseamos sembrar, y realizamos el estriado correctamente en agar selectivo para *Brucella*.
- Se Incubó durante 7 días
- Se observó las características macroscópicas.

2.4.6. Prueba confirmatoria del crecimiento de *E. coli* en agar eosina azul de metileno

2.4.6.1. Preparación

- De acuerdo a las instrucciones establecidas en el envase del agar (36 g en 1L de agua), efectuar los cálculos correspondientes de acuerdo al volumen requerido.
- Se pesó los gramos del agar que sean necesarios.
- Se colocó el agar en un Erlenmeyer, agregar un poco de agua destilada y disolvimos por agitación.
- Se incorporó el agua destilada restante para completar el volumen requerido y se calentó el medio en un reverbero para una completa disolución.
- Dejamos hervir por 1 minuto y retirarlo del fuego.
- Esterilizamos el medio en autoclave por 30 minutos. Luego se esperó que su temperatura disminuya hasta 45°C aproximadamente.
- Se colocó el medio de cultivo en cajas Petri y dejar que éste se solidifique.

2.4.6.2. Siembra:

- Cogimos las placas Petrifilm para *E. coli* y con un asa estéril tomar una colonia azul con gas de la película superior que contiene gel.

- Sembramos por estría en agar eosina azul de metileno.
- Se incubó las cajas Petri a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.
- Observamos el crecimiento bacteriano.

2.4.6.3. Lectura e interpretación:

Se confirmó la presencia de *Escherichia coli* en aquellas cajas Petri que se observó colonias oscuras con brillo verde metálico.

2.4.7. Confirmación de *Staphylococcus aureus* mediante fermentación del manitol.

2.4.7.1. Preparación

- Efectuamos los cálculos correspondientes a los gramos que se requirieron pesar de acuerdo al volumen del medio que utilizamos según las indicaciones contenidas en el envase del agar (111.02g/L de agua).
- Pesamos los gramos necesarios y colocamos en un Erlenmeyer.
- Disolvimos el agar colocando una pequeña cantidad de agua destilada y agitamos.
- Se agregó el volumen de agua destilada restante, calentamos y dejamos hervir por un minuto.
- Esterilizamos el medio en el autoclave por 30 minutos.
- Se dejó que su temperatura disminuya (45°C aprox.) y colocamos en cajas Petri un volumen de 15 a 20 mL en cada una.
- Esperamos que el medio se solidifique y está listo para su empleo.

2.4.7.2. Siembra

- Tomamos las placas Petrifilm Staph Express que contengan colonias moradas y con la ayuda de un asa de platino estéril, se tomó una colonia de la película superior que contiene el gel.
- Sembramos por estría el contenido del asa en la caja Petri identificada.
- Invertimos la placa e incubamos a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas

- Observamos el crecimiento bacteriano

2.4.7.3. Lectura e interpretación

Confirmamos la presencia de *Staphylococcus aureus* en aquellas placas que presentaron crecimiento de colonias amarillas y a su alrededor una zona del mismo color.

2.4.8. Aislamiento y purificación

1. Preparar Agar Mueller Hinton (medio de cultivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano):
 - Se suspendió los gramos respectivos de polvo en la cantidad de agua purificada que se requiera (38g en 1L de agua destilada), dependiendo la cantidad de placas a preparar.
 - Se calentó con agitación frecuente y hervimos hasta que se disuelva totalmente y mandar al autoclave por 30 minutos para que se esterilice.
 - Enfriamos y se distribuyó en las placas Petri estériles, en volumen apropiado aproximadamente 4mm sobre una superficie horizontal.
2. Realizar el primer repique:
 - Con un palillo estéril tocamos la colonia que se deseamos aislar, y picamos sobre la placa con Agar Mueller Hinton, para ello se usa una cuadrícula que nos sirva de guía para sembrar nuestras colonias.
 - Se incubó a 35°C durante 24 horas.
 - Se observó las características macroscópicas.
3. Realizar el segundo y tercer repique:
 - Partiendo de las colonias que crecieron en el Agar Mueller Hinton, se realizó el segundo repique, siguiendo los mismos pasos del primero.
 - Partiendo de las colonias que crecieron en el segundo repique, se realizó el tercer repique, siguiendo los mismos pasos del primero.
4. Con cada colonia crecida a partir del último repique realizado, hicimos una siembra por agotamiento o en estría:

- Tocando con suavidad la superficie del medio, se extendió la muestra tratando de que el extendido sea lo más largo posible con el objetivo de conseguir al final del mismo células aisladas.
- Al destapar la placa mantuvimos la tapa en la mano, abriéndola solo lo necesario para realizar la siembra.
- Cerramos la placa y se incubó en posición invertida a 37°C, durante 24 horas.

2.4.8.1. Descripción macroscópica de colonias

- Una vez pasado el tiempo de incubación se observó las placas en contra luz.
- Se identificó la forma de las colonias (circular, puntiforme, irregular, etc.)
- Observar:
 - bordes (entero, ondulado, filamentoso)
 - superficie (lisa, rugosa, plegada)
 - Color
 - Luz transmitida a través de la colonia (opaca, translúcida, transparente)

Luz reflejada en la superficie de la colonia (opaca, brillante) (Microdonto, 2009)

2.4.9. Tinción Gram

Una vez estabilizado el aislado bacteriano, realizar la tinción Gram con cada una de las colonias:

- Se tomó una pequeña muestra de la cepa y fue diluida en la solución salina colocada en el porta objetos.
- Con ayuda del mechero fijamos la muestra, sin calentar más de lo que la mano puede soportar.
- Se colocó cristal violeta esperar 1 minuto y enjuagar.
- Se colocó lugol esperar 1 minuto y enjuagar.
- Se colocó alcohol cetona esperar 50 segundos y enjuagar.
- Se colocó safranina esperar 1 minuto y enjuagar.

Secamos la muestra y observamos en el microscopio a 100X. (Vizcarrondo, Gutiérrez, 2008)

2.4.10. Prueba de la Oxidasa

- Con una tirilla para prueba de oxidasa se colocó la colonia recién reactivada.
- Observamos el resultado: si la tirilla se tornó azul se considera oxidasa positiva, si la tirilla no sobre ningún cambio se considera oxidasa negativa.

Se repitió este proceso con cada una de las colonias puras reactivadas. (Fernández, et al., 2010)

2.4.11. Producción de catalasa

1. Se emulsiono una colonia en un portaobjeto con una gota de agua oxigenada de 10 volúmenes.

Observamos si existió desprendimiento de burbujas, lo que corresponde a una prueba positiva. (Fernández, et al., 2010)

2.4.12. Identificación de bacterias mediante el Sistema de Identificación Bioquímica MicrogenTM

- Se inoculo cada colonia en 3-5 mL de solución salina al 0.85%.
- Se colocó de 3-4 gotas (100µL) de la solución en cada pocillo.
- Se colocó de 3-4 gotas de aceite mineral en los pocillos que así lo requieran, es decir donde la guía rápida del producto indique.
- Se incubó de 24-48 horas a una temperatura de 35-37°C.
- Se realizó una lectura inicial de cada pocillo. (Figura 3.2).
- Adicionamos los reactivos necesarios en los pocillos que así lo ameritaron, es decir donde la guía rápida del producto indique.
- Realizamos la lectura final de resultados, guiándonos en la tabla de colores indicada en la guía rápida del producto.
- Se llenó la hoja de resultados de Microgen, según los valores descritos en la misma, para obtener un valor numérico de 9 dígitos

Microgen™ GN A ID												
WELLS/REACTIVES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reactive	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA
Negative	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Blue	Blue	White	Yellow	White	White	Yellow	Yellow
Positive	Blue	Blue	Black	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Purple	Red	Blue	Red

Microgen™ GN B ID										
WELLS/REACTIVES	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Reactive	Adonitol	Raffinose	Sorbitol	Arginine Dihydrochloride	Arginine Dihydrochloride					
Negative	White	Yellow	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Yellow	Yellow
Positive	Black	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Blue

Figura 3.2: Tabla de colores Microgen™ GnA+B-ID System

Fuente: MICROGEN TM, 2007

- Introducimos el perfil numérico en el Software Microgen Identification System, este genera un informe de los cinco microorganismos más parecidos en una base de datos selectiva. (Microgen™, 2007)

MICROGEN GN-ID A+B PANEL																											
REPORT FORM																											
Lab. No. <u>3341</u>			Specimen Type: <u>CHEESE SANDWICH</u>												Date: <u>28TH JANUARY 2002</u>												
Well Number			GN A wells												GN B wells												
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				6	7			6	0			0			7	6			0								
Profile No: <u>67600760</u>			Final Identification: <u>E. coli</u>																								

Figura 4.2: Ejemplo de la hoja de resultados de Microgen

Fuente: MICROGEN TM, 2007

2.4.13. Difusión en disco

Una vez que se aisló las colonias del organismo que vamos estudiar, es necesario seguir lo siguientes pasos para realizar la prueba de susceptibilidad.

- 1) Primero se seleccionó las colonias
- 2) Se preparó una suspensión del inóculo
- 3) Se estandarizó la suspensión de inóculo
- 4) Se inóculó la placa
- 5) Se procedió a colocar los discos de antibióticos
- 6) Dejamos incubar a la placa
- 7) Después del tiempo de incubación se midió las zonas de inhibición
- 8) Se interpretaron los resultados (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)



Figura 5.2: Selección de las colonias bien aisladas para el inóculo

Fuente: Cavalleri, J. et al, 2005

2.4.13.1. Selección de colonias

La correcta selección de las colonias es muy importante ya que nos servirá para el proceso de suspensión del inóculo.

Se seleccionó de 3 a 5 colonias del microorganismo patógeno que se va a analizar. Se tomó las colonias con un hisopo de algodón y de colonias bien aisladas en el cultivo. (Figura 4.2) (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

2.4.13.2. Como se debe preparar y estandarizar la suspensión del inocular

Utilizamos el método de Suspensión directa de colonias; las colonias no pueden exceder las 18 a 24 horas de aislamiento. La suspensión se preparó en solución salina o en caldo (Mueller Hinton o soya triptica). La turbidez de la suspensión se estandarizo, al estándar de 0,5 de McFarland ya que va a corresponder a un valor de $1,5 \times 10^8$ CFU/ml y se la midió colocando los tubos sobre la hoja de papel blanca con rayas negras.(Figura 5.2) (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)



Figura 6.2: Estandarización del Inocular

Fuente: Cavalleri, J.et al, 2005

2.4.13.3. Como Inocular la placa

Primero se tuvimos que dejar que el agar Mueller Hinton se caliente a temperatura ambiente y asegurarnos que las placas cuenten con la profundidad adecuada de 4 mm.

Después empezando desde la parte superior de la placa pudimos inocular la superficie con ayuda del hisopo, cubriendo toda la placa desde cada borde ida y vuelta correspondientemente. Se debe rotar la placa aproximadamente 60° y repetir el proceso de frotado. Se debe rotar una tercera vez la placa para realizar la misma operación. Esto nos garantizó que el inocular se distribuyó homogéneamente por toda la placa. (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

2.4.13.4. Como colocar los discos de Antibióticos

Primero se tuvo los discos fuera del congelador para que estén a temperatura ambiente. Se colocó los discos dentro de los 15 minutos siguientes de la inoculación en nuestra placa de Agar Mueller Hinton. Procedimos a colocar uno a uno nuestros discos, presionando cada disco para asegurarnos

que tengan contacto con la superficie de la placa. (Figura 6.2) (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)



Figura 7.2: Colocación y presionado de los disco en la superficie de la placa

Fuente: Cavalleri, J.et al, 2005

2.4.13.5. Como incubar la placa

- Se invirtió las placas e incubarlas
- Se incubo a 35 C por 16 a 18 horas. (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

2.4.13.6. Como medir los resultados

Al sacar las placas de la incubadora, se examinó detenida y minuciosamente la placa para poder constatar que el crecimiento ha sido uniforme de tal manera que se pueda diferenciar zonas en donde no haya crecimiento microbiano. (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

Se siguió los siguientes pasos:

- Sostuvimos la placa sobre una superficie oscura en donde no se refleje la luz
- Medimos redondeando al milímetro más cercano con la ayuda de un calibrador o de una regla.(Figura 7.2) (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

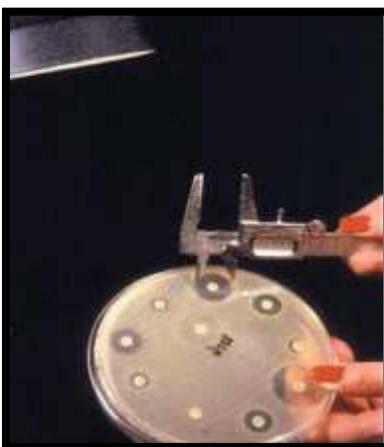


Figura 8.2: Medición de los halos de inhibición en la parte posterior de la placa

Fuente: Cavalleri, J. et al, 2005

2.4.13.7. Variables de control de la prueba de Difusión por Discos

- El pH del medio
- Concentración de inóculo
- Composición del medio de cultivo
- Profundidad del agar
- Procedimiento de inoculación
- Almacenamiento de los discos
- Cantidad de discos en la placa
- Temperatura y atmósfera de incubación
- El tiempo de la incubación
- Medición de las zonas de inhibición. (Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005)

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis microbiológico de la leche cruda

Los resultados que se exponen a continuación corresponden a tres muestreos, cada uno de ellos consta de seis muestras de leche cruda tomadas en el la Empresa de Lácteos “La Herencia” en San Andrés y en La empresa de lácteos “Santa Fe” en Tushi.

Los muestreos se llevaron a cabo por tres semanas, recogiendo cada lunes las seis muestras para su posterior análisis.

3.1.1. Recuento de *Escherichia coli* de la leche cruda

Tabla 1.3: Recuento de microorganismos *Escherichia coli* totales en leche cruda.

BACTERIA		<i>Escherichia coli</i>					
		Nro DE BACTERIAS POR MUESTREO UFC/mL					
Lácteos Santa Fe							
Proveedores	Muestreo 1 UFC/mL	Muestreo 2 UFC/mL	Muestreo 3 UFC/mL	Media UFC/mL	Varianza	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Enrique	5000	1000	3000	3000	4000000	2000	0,6667
Isabel	10000	2000	9000	7000	19000000	4358,9	0,6227
Jorge	20000	286000	1000	102333,3 33	2,54E+10	159343	1,5571
Lácteos la Herencia							
Edgar	5000	2000	6000	4333,333 33	4333333	2081,7	0,4804
Mónica	7000	19000	3000	9666,666 67	69333333	8326,7	0,8614
Marichui	2000	6000	2000	3333,333 33	5333333	2309,4	0,6928

Realizado por: Jhonnatan Granizo

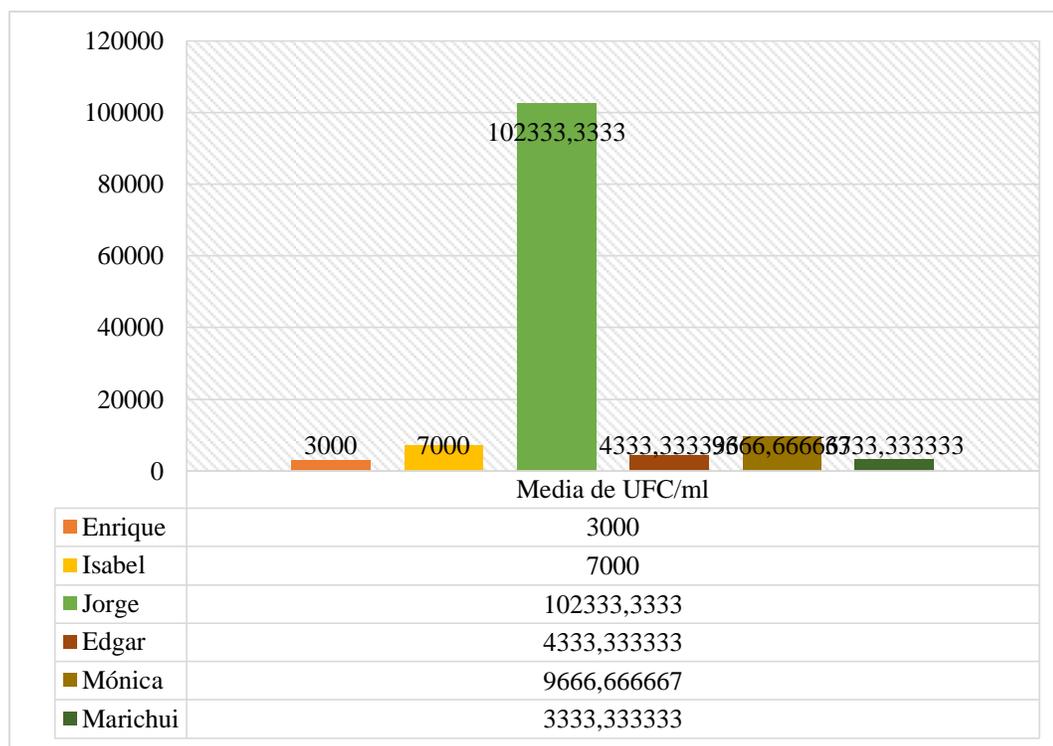


Gráfico 1.3: Recuento de *e Escherichia coli* en leche cruda.

La presencia de dicha bacteria es un indicativo de contaminación fecal por el inadecuado e insuficiente manejo higiénico de la rutina de ordeño sobretodo de la limpieza de la piel de los pezones, manos del ordeñador y pezoneras así como la exposición de la leche a material fecal. (Moreno, 2007)

Moreno et al., 2007 demostró que la cantidad de Coliformes totales tiene una relación entre el secado de los pezones previo ordeño y a la ausencia del secado, es así que reportó un recuento de 134.600 UFC/mL en los sistemas productivos carentes de secado y 78.026 UFC/mL en los sistemas productivos que practican el secado de pezones, por lo que manifestó que los pezones húmedos sometidos a ordeño aumentan el riesgo de infecciones intra mamarias debido a que el agua conduce los microorganismos hasta la punta del pezón contaminando la leche y elevando el riesgo de infección. También investigó la influencia del proceso de desinfección en el recuento de coliformes obteniendo como resultados 162.250 UFC/mL en situaciones que no se realiza la desinfección en los hatos y de 68.626 UFC/mL al ejecutarse la desinfección. (Moreno, 2007)

De acuerdo al Reglamento Técnico RTCR: 401-2006 se establece que la cantidad estándar máxima permisible de *Escherichia coli* es de 100 UFC/mL, lo cual al apreciar en la tabla puede observarse que ninguna de las muestras cumplen con este parámetro microbiológico y se las puede considerar que no son aptas para el consumo de la población o para su empleo en la fabricación de derivados lácteos (RTCR, 2006)

En Bolivia Mariscal, et al., 2013, reportaron que el 100% de las muestras de leche expendidas en los mercados de abasto de presentaron valores mayores al aceptado (200 UFC/mL) para organismos coliformes por lo que no se les considera leches de buena calidad y aptas para el consumo humano. (Mariscal, 2013)

Martínez A, et al., 2015 llevó a cabo el estudio microbiológico en Cuba de la leche cruda de una cadena de producción, arrojando como resultados que el promedio de *Coliformes totales* fue de 1×10^5 UFC/mL en tanto que *Escherichia coli* fue positiva para el 98% de las muestras, alto recuento que indica las inadecuadas condiciones higiénicas que favorecen su crecimiento (Martínez, 2015)

3.1.2. Crecimiento de *E. coli* en agar eosina azul de metileno.

Se aplicó la prueba confirmatoria sembrando los inóculos en agar eosina azul de metileno e igualmente para confirmar que las colonias azules con gas que crecieron en las placas Petrifilm se trataban de *E. coli*.

En la confirmación se pudo observar el crecimiento de colonias que varían del color púrpura a verde metálico al ser reflejadas la luz, que es característico de la *Escherichia coli* ya que es una bacteria fermentadoras de la lactosa.

Finalmente en los resultados obtenidos en la cuantificación de la *Escherichia coli* podemos observar que en todas las muestras tomadas hubo crecimiento bacteriano en diferentes proporciones, ya que en el muestreo 1 y 3 existe una similitud en cuanto al recuento bacteriano a diferencia del muestreo 2, que es donde se pudo cuantificar un mayor número de bacterias. Por esto necesario identificar los puntos de control a lo largo de la cadena alimentaria para reducir al mínimo los riesgos para la salud pública. Se deben seguir pasos para la mitigación de los riesgos de acuerdo con los códigos reconocidos de buenas prácticas y las recomendaciones pertinentes de los servicios veterinarios y de salud pública. (FAO, 2012)

3.1.3. Recuento de *Staphylococcus aureus* de la leche cruda

Tabla 2.3: Recuento de microorganismos *Staphylococcus aureus* totales en leche cruda.

BACTERIA		<i>Staphylococcus aureus</i>					
		Nro DE BACTERIAS POR MUESTREO UFC/mL					
Lácteos Santa Fe							
Proveedores	Muestreo 1 UFC/mL	Muestreo 2 UFC/mL	Muestreo 3 UFC/mL	Media UFC/mL	Varianza	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Enrique	36000	115000	25000	58666,6667	2,41E+09	49095	0,8368
Isabel	25000	14000	22000	20333,3333	32333333	5686,2	0,2797
Jorge	16000	36000	21000	24333,3333	1,08E+08	10408	0,4277
Lácteos la Herencia							
Edgar	56000	24000	26000	35333,3333	3,21E+08	17926	0,5073
Mónica	47000	81000	8000	45333,3333	1,33E+09	36529	0,8058
Marichui	14000	32000	89000	45000	1,53E+09	39154	0,8701

Realizado por: Jhonntan Granizo

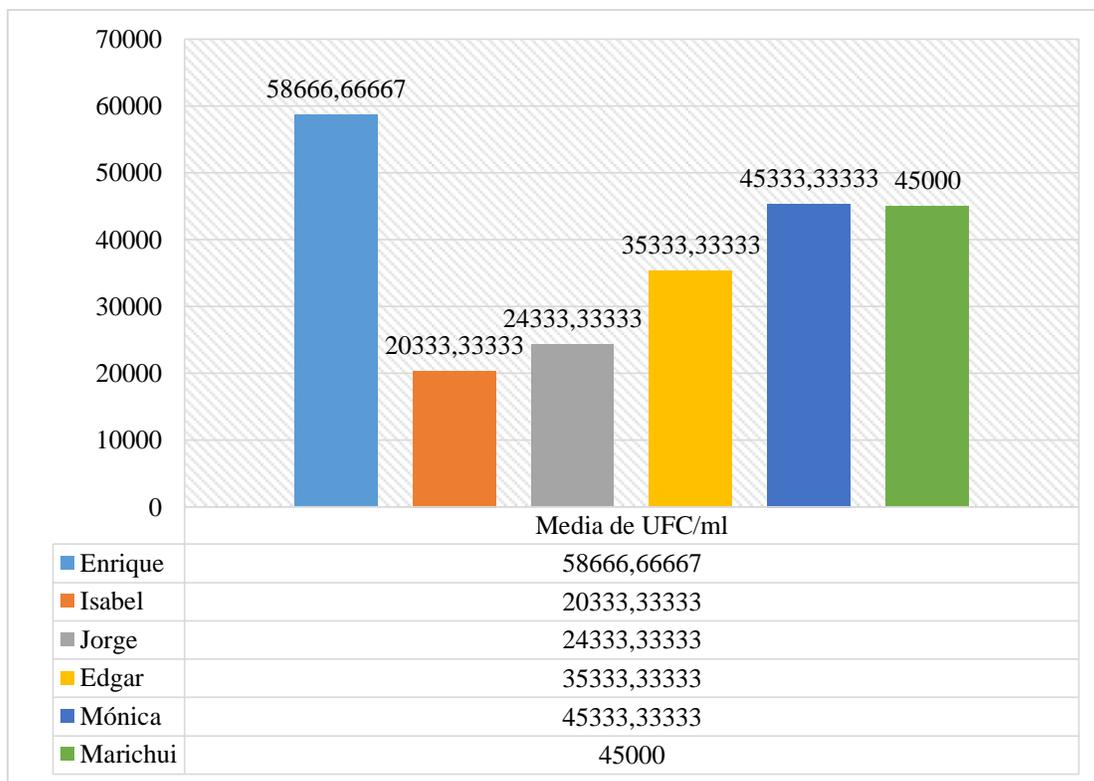


Gráfico 2.3: Recuento de *Staphylococcus aureus* en leche cruda.

El alto recuento de *Staphylococcus aureus* puede deberse a posibles lesiones o heridas de las vacas que infectan la glándula mamaria y se transmite a los cuartos con animales sanos por medio de pezoneras, uso común de paños para limpiar las ubres o las manos del ordeñador.

En el Reglamento Técnico 401-2006 se establece que el recuento máximo permitido de *Staphylococcus aureus* en leche cruda es de 500 UFC/mL, valor en los que no se encuentran nuestras muestras ya que obtuvimos valores que van desde 8000 UFC/mL hasta un máximo de 115000 UFC/mL, por lo tanto se puede decir que nuestras muestras de leche no cumplen con el parámetro microbiológico indicado para considerarlas aptas para consumo humano o para ser usadas en derivados de lácteos. (RTCR, 2006)

En un estudio realizado por Moreno, et al., 2003, en donde también se pudo evidenciar un alto conteo microbiológico al evaluar la presencia de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche cruda obtuvieron en el primer muestreo un promedio de 62206 UFC/mL y en el segundo muestreo un promedio de 5575 UFC/mL. Además también se demostró la influencia del secado de los pezones de las vacas antes de ordeñarlas, ya que se obtuvieron resultados altos en los casos en los que las

ubres se encontraban húmedas pues se reportaron 87600 UFC/mL y disminución de la cantidad de microorganismos al secar los pezones consiguiendo un recuento de 21481 UFC/mL, de esta manera podemos decir que esta operación si influye en gran medida para el conteo bacteriano y disminuir las infecciones intra mamarias producidas por este agente. (Moreno, 2007)

En Argentina, 2008 se realizó un estudio sobre la calidad higiénica de la leche cruda mediante marcadores microbiológicos en donde se determinó al *Staphylococcus aureus* con un mayor recuento en aquellas muestras recolectadas directamente de la ubre de la vaca en relación a la leche tomada del tanque de enfriamiento, resultados que confirmarían que esta región anatómica es una fuente natural de estos microorganismos y al mismo tiempo es el único sitio de contacto indirecto entre la leche y las manos de los operarios, las cuales podrían constituir una fuente potencial de contaminación. (Signorini, 2008)

En otro estudio por Martínez, et al., 2013, analizaron 149 muestras de leche en dos épocas del año verano e inviernos cuyos promedios de *Staphylococcus aureus* fueron altos de 2.8×10^6 y 5.4×10^5 UFC/mL respectivamente. El mayor recuento de los agentes microbianos se obtuvo en verano constituyendo un riesgo de intoxicación alimentaria debido a que se admite que se requiere de 105/g de alimento para la formación de toxina suficiente para producir intoxicación. Además los elevados recuentos indican una posible infección intra mamaria. (Martinez , Gomez, 2013)

3.1.4. Fermentación en agar manitol salado por presencia de Staphylococcus aureus en muestras de leche cruda

Se aplicó la prueba confirmatoria en agar manitol salado, la fermentación de manitol, indicada por el cambio del indicador de rojo fenol, facilita la diferenciación de la especie de estafilococos. Los estafilococos positivos a la coagulasa como el *Staphylococcus aureus* producen colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo; de esta forma confirmamos la presencia de esta bacteria.

En la confirmación las bacterias que se sembraron en agar manitol salado, fermentaron y se visualizó las colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color, que es característica de esta prueba para *Staphylococcus aureus* ya que hidrolizan el manitol acidificando el medio.

En los resultados obtenidos en el recuento de *Staphylococcus aureus* podemos observar que existe un alto crecimiento de dicha bacteria que supera a las demás, teniendo en cuenta que en dependencia de cada proveedor aumenta o disminuye el número de conteo bacteriano; en el

muestreo 2 existe mayor recuento, seguido del 3 y por último el primero. Esto nos hace ver que no existe un control adecuado en la cadena de la producción lechera desde el ordeño hasta la comercialización de la misma.

3.1.5. Recuento de *Brucella* de la leche cruda

Tabla 3.3: Recuento de microorganismos *Brucella abortus* Totales en leche cruda

BACTERIA		<i>Brucella abortus</i>
PROVEEDORES	Nro DE BACTERIAS POR MUESTREO UFC/mL	
Enrique 1	no hubo crecimiento	
Enrique 2	no hubo crecimiento	
Enrique 3	5 UFC	
Edgar 1	no hubo crecimiento	
Edgar 2	no hubo crecimiento	
Edgar 3	no hubo crecimiento	
Marichui 1	no hubo crecimiento	
Marichui 2	no hubo crecimiento	
Marichui 3	no hubo crecimiento	

Realizado por: Jhonnatan Granizo

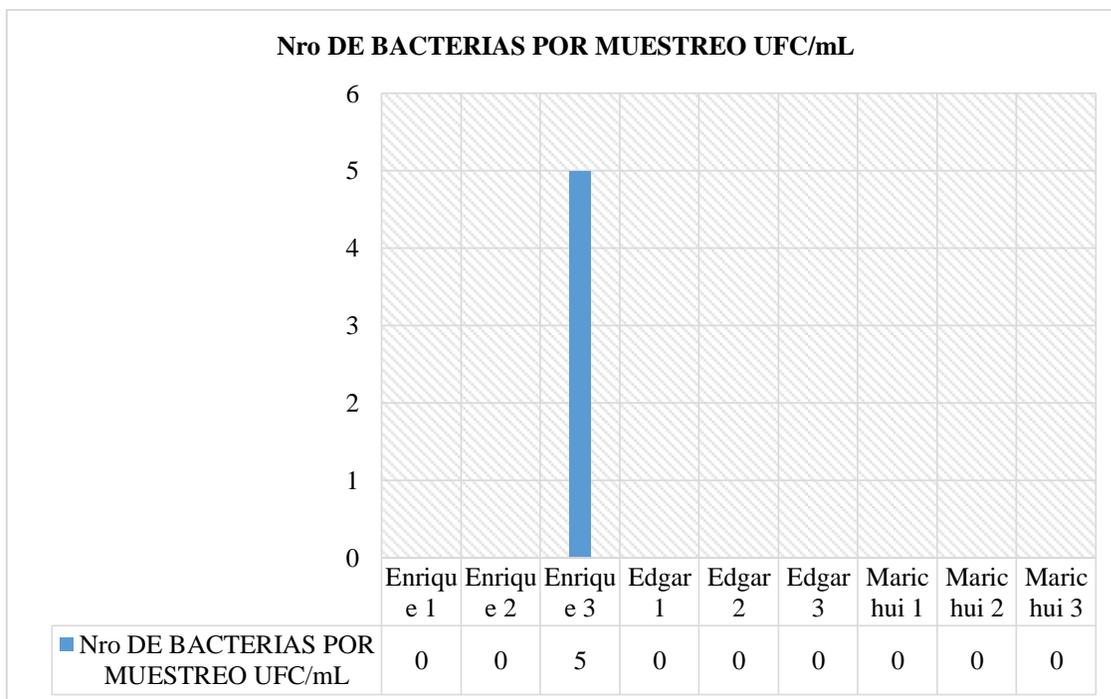


Gráfico 3.3: Recuento de *Brucella abortus* en leche cruda.

La brucelosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa conocida como aborto infeccioso. Afecta a bovinos de todas las edades, pero persiste con mayor frecuencia en animales sexualmente adultos, principalmente en ganaderías de cría y leche; además, son susceptibles a la enfermedad otras especies como los porcinos, ovinos, caprinos, equinos y búfalos; en ellas produce variados signos. La brucelosis es una zoonosis, ya que se transmite en forma natural de los animales vertebrados al hombre. Atenta contra la salud de los ganaderos y del personal de campo, así como de los consumidores de leche de animales enfermos. (Osorio, 2010)

Rodríguez, et al., 2012, presentaron la situación epidemiológica de la brucelosis en España, según los datos del Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) y del Sistema de Brotes. La tasa de incidencia en 2011 fue de 0,22 casos/100.000 habitantes. Esta zoonosis está asociada fundamentalmente al ámbito rural y ganadero, y su incidencia ha disminuido de forma notable los últimos años debido a las campañas de saneamiento. (Rodríguez, et al., 2012)

En el trabajo de Vergara, et al., 2006, se determinó la prevalencia de Brucelosis en la leche cruda que se expende en el Municipio de Popayán. Se evaluaron 247 muestras de leche cruda comercializadas en el municipio de Popayán a través de 11 rutas, dando como resultado una prevalencia encontrada de 15 % (37/247). Además podemos decir que la presencia de brucelosis puede asociarse con la procedencia de la leche cruda, la nutrición de los animales, convivencia con

especies menores, vacunación y retención de placenta; debido a que son factores condicionantes y predisponentes que hacen parte del proceso productivo de leche, los cuales pueden prevenirse y controlarse mediante el establecimiento de medidas sanitarias pertinentes. (Vergara, et al., 2008)

En otro estudio en Venezuela, 2004 se realizó una investigación seroepidemiológica en todos los sectores del municipio La Cañada de Urdaneta donde se midió la prevalencia de brucelosis bovina e un total de 387 rebaños bovinos con una población de 47.421 hembras mayores de 24 meses de edad, donde se analizaron 384 muestras, con el uso de la técnica de ELISA, obteniéndose como resultado una seroprevalencia de 20,3% para rebaños y 9,1% por animal. Con estos resultados nos podemos dar cuenta que existe aún un alto porcentaje de *Brucella* en ganado bovino. (D'Pool, et al., 2004)

Como podemos observar en la cuantificación de la *Brucella*, hubo solo un leve crecimiento en una de las nueve muestras analizadas, que fue sembrada en el medio con el suplemente selectivo para la misma. Esto nos permite tener una visión y decir que no existe la presencia de esta bacteria en la leche cruda analizada.

Podemos ratificar lo dicho ya que al realizar las pruebas confirmación en el Microgen Identification System que es el sistema en donde se utiliza substratos bioquímicos estandarizados en pocillos para identificar la familia Enterobacteriaceae y otros bacilos no-exigentes Gram negativos, no dio un resultado para esta bacteria. Además al realizar la tinción Gram pudimos observar al microscopio que la morfología de las colonias que obtuvimos no era la de la *Brucella*, lo que vuelve a ratificar que no existe la presencia de esta bacteria.

3.1.6. Tinción Gram

Se observaron al microscopio las muestras sembradas en colonias que crecieron en el Agar Mueller Hinton después del repique, las que presentaron la morfología de un bacilo que reacciono negativamente a la tinción de Gram (Gram negativo), estas características mencionadas son las que permiten identificar que la bacteria observada es la *Escherichia coli*. (Rodríguez, 2002)

Las muestras en las que se observó bacterias de forma circular agrupadas en pares, formando cadenas cortas o a manera de racimo y desagrupadas, con una coloración rosada, indicativo de reacción positiva frente a la tinción Gram. (Cervantes & al., 2002)

En la muestra en donde supuestamente creció la *Brucella* al realizar la tinción Gram no se pudo observar su morfología característica que es cocobacilos Gram negativos. Al contrario se pudo

observar cocos negativos lo que nos hace presumir que hubo una contaminación pero claramente que no hay existencia de *Brucella*. (Ryan KJ, Ray CG, 2004)

3.1.7. Lectura de sistema Microgen Identification System

Tabla 4.3: Identificación de bacteriana por sistema Microgen Identification System

MUESTRA	OXIDASA	BACTERIA
Mari 1	Negativo	<i>Staphylococcus aureus</i>
Mari 2	Negativo	<i>Escherichia coli</i>
Mari 3	Negativo	<i>Staphylococcus aureus</i>
Enrique 1	Negativo	<i>Staphylococcus aureus</i>
Enrique 2	Negativo	<i>Staphylococcus aureus</i>
Enrique 3	Negativo	<i>Escherichia coli</i>
Edgar 1	Negativo	<i>Escherichia coli</i>
Edgar 2	Negativo	<i>Shigella spp.</i>
Edgar 3	Negativo	<i>Shigella spp.</i>

Los resultados obtenidos en las pruebas del Microgen Identification System nos permitieron tener una visión más clara de las bacterias que están en estudio, y a la vez nos dan crédito en los resultados de las pruebas anteriores.

Después de la identificación Microgen Identification System las cepas aisladas fueron *Escherichia coli*, *Shigella spp* y *Staphylococcus aureus*, de esta manera confirmando la presencia de nuestras bacterias en investigación.

Bou, et al., 2011, en su artículo publicado en la Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica afirma que con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable del proceso infeccioso y para conocer las implicaciones patogénicas/patológicas, la evolución clínica, y aplicar una terapia antimicrobiana eficaz, un pilar fundamental en la práctica de la microbiología clínica lo que constituye la asignación de especie a un aislamiento microbiano. Uno de estos métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología es el Microgen Identification System que por medio de códigos numéricos nos proporciona el nombre de la bacteria ha dado buenos resultados. (Bou, 2011)

Los métodos rápidos y automatizados en microbiología de los alimentos requieren un tiempo reducido para la obtención de los resultados en comparación con los métodos “convencionales”, y son fáciles de usar, precisos y económicamente rentables. Entre los sistemas miniaturizados de identificación microbiana disponibles en la actualidad, basados en el metabolismo de sustratos específicos por parte de los microorganismos y su detección mediante diversos sistemas indicadores, tenemos Microgen Identification System, que constan de soportes plásticos con pocillos de fácil inoculación que contienen sustratos cromogénicos y/o fluorogénicos en estado deshidratado que se rehidratan en contacto con la muestra. (VISAVET, 2008)

Becerra M, 2014 en su investigación de microorganismos patógenos en salchichas en los mercados de Cuenca, donde utilizo las pruebas confirmatorias Microgen Identification en donde encontré *Escherichia coli* en un 50 % y un *Shigella* un 34%. Los que se puede asumir a la falta de refrigeración, a los utensilios de almacenaje, a la temperatura ambiental, es decir a unas malas prácticas de las buenas prácticas de manufactura.

En otro estudio de Llop. et al., 2001, la presencia de *Escherichia coli* y *Shigella*, es un indicativo de mala higiene, ya que al ser el hombre un reservorio de manera natural y la contaminación se realiza de manera oral-fecal. (Llop, 2001)

La *E. coli* es casi exclusivamente de origen fecal y se transmite a través de la contaminación fecal de los alimentos y del agua, así como también a través de la contaminación cruzada o por contacto humano directo durante la preparación de los alimentos. Mientras tanto, la principal vía de exposición pareciera ser el consumo de alimentos contaminados, como es el caso de la leche cruda. Esta bacteria puede ocasionar a menudo diarrea aguda con sangre y calambres abdominales; a veces, la infección ocasiona diarrea sin sangre o no ocasiona síntomas. Por estas razones la presencia de esta bacteria es un problema de salud pública. (FAO, 2012)

En el caso del *Staphylococcus aureus* debido a la producción de toxinas (sustancias tóxicas), puede causar problemas de mastitis en las vacas que van desde infecciones sin manifestaciones clínicas a infecciones clínicas o gangrenosas que pueden matar a la vaca.

La enfermedad estafilocócica transmitida por alimentos, resulta de la ingestión de enterotoxinas termoestables preformadas por una cepa toxigénica de *Staphylococcus aureus* que contaminó y desarrolló en el alimento. La contaminación de alimentos por *S. aureus* está asociada con una forma de gastroenteritis que se manifiesta por un cuadro caracterizado por vómitos y diarrea. (Rodríguez, 2005)

La *Shigella spp.* Causa la enfermedad llamada Shigelosis (disentería bacilar) enfermedad que causan representa menos del 10% de los brotes reportados de enfermedades transmitidas por los alimentos. La contaminación de estos alimentos se da generalmente por la ruta oral-oral. El agua contaminada con heces fecales y el manejo antihigiénico de los alimentos por los manipuladores son las causas más comunes de contaminación. Los síntomas que causa esta enfermedad son dolor abdominal, calambres, diarrea, fiebre, vómito, sangrado, pus o mocos en las heces fecales; tenesmo. (Gimferrer, 2013)

3.1.8. Antibiograma de *Escherichia coli*

Tabla 3.3: Porcentaje de resistencia y sensibilidad de *Escherichia coli* frente a 6 antibióticos.

Muestras	Discos de Antibióticos					
	Estreptomina 10 mcg	Ampicilina 10 mcg	Kanamicina 10 mcg	Gentamicina 30 mcg	Nitrofurantoina 300 mcg	Tetraciclina 30 mcg
<i>Escherichia coli 1</i>	R	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli 2</i>	S	R	S	S	S	R
<i>Escherichia coli 3</i>	S	S	S	S	S	S
% de sensibilidad por antibiótico	67%	67%	100%	100%	100%	67%
% de resistencia por antibiótico	33%	33%	0%	0%	0%	33%

Realizado por: Jhonnatan Granizo

En los resultados obtenidos podemos darnos cuenta que la muestra número 1 presenta una resistencia a la estreptomina que es un aminoglucósido antibacteriano, seguido de la muestra número 2 que presenta un resistencia en la Ampicilina que es una penicilina con el espectro ampliado y también en las tetraciclinas. Todos estos antibióticos son poderosos antibacterianos que sirven para combatir a bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Shigella spp.*,

Salmonella spp., *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, que son causantes de enfermedades comunes en el ganado bovino como son la mastitis, infecciones urinarias y respiratorias, heridas, disentería etc. Comparando con otros estudios podemos ratificar de la existencia de la resistencia a estos antibióticos que pudimos mencionar.

Sánchez. et al.2008, determinó la resistencia in vitro de este germen a diversos antibióticos de uso frecuente: fosfomicina, nitrofurantoína, tobramicina, cefuroxima, cefixima, amoxicilina-clavulánico, cotrimoxazol, ciprofloxacino, norfloxacino y ampicilina. Se ha producido un aumento de la resistencia de los aislamientos urinarios de *Escherichia coli* a todos los antimicrobianos estudiados, menos para la nitrofurantoína, que fue estadísticamente significativo en la mayoría de los casos. También nos dice que la resistencia frente a fosfomicina y nitrofurantoína se ha mantenido por debajo del 6% a lo largo del periodo de estudio. Para tobramicina y cefuroxima apenas ha superado el 10% y para cefixima se encuentra por debajo del 3,4%, aunque en este último caso sólo se dispone de datos hasta 2005 en nuestro estudio. La resistencia frente a amoxicilina-clavulánico, inicialmente baja, ha ido aumentando progresivamente hasta alcanzar el 20,6% en 2007. Lo mismo ocurre para cotrimoxazol, ciprofloxacino, norfloxacino y ampicilina, hasta superar el 32% en 2007 en el caso de los tres primeros y el 62% en el último. (Sanchez, 2008)

San Martín.1991, en su estudio de resistencia bacteriana frente a diferentes antibióticos utilizados en mastitis clínica bovina, determinó que la *E. coli*, mostró porcentajes de resistencia de 25.8% a Amoxicilina; frente a Neomicina y Ampicilina, fue de un 5.3% y 10.5% de cepas resistentes respectivamente. (San Martín, 1991)

Los datos de los programas de vigilancia ponen de manifiesto que la resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública cada vez mayor en los hospitales y en la sociedad europea. La resistencia de *Escherichia coli* a los principales antibióticos está aumentando en casi todos los países de Europa. *E. coli* provoca infecciones urinarias y otras infecciones más graves y es una de las bacterias causantes de infecciones más frecuentes (ECDC, 2014)

La resistencia a las fluoroquinolonas, una de las clases de fármacos antibacterianos más utilizadas en el tratamiento de las infecciones urinarias por *E. coli*, está muy extendida. En los años ochenta, cuando aparecieron estos fármacos, la resistencia a ellos era prácticamente inexistente. Hoy día hay países de muchas partes del mundo en los que este tratamiento es ineficaz en más de la mitad de los pacientes. (OMS, 2014)

La leche es un producto básico en la canasta familiar, es fuente de ingresos de los ganaderos del país. Es necesario implementar medidas como la educación a los ganaderos y estrictos programas de vigilancia y control para contener este problema.

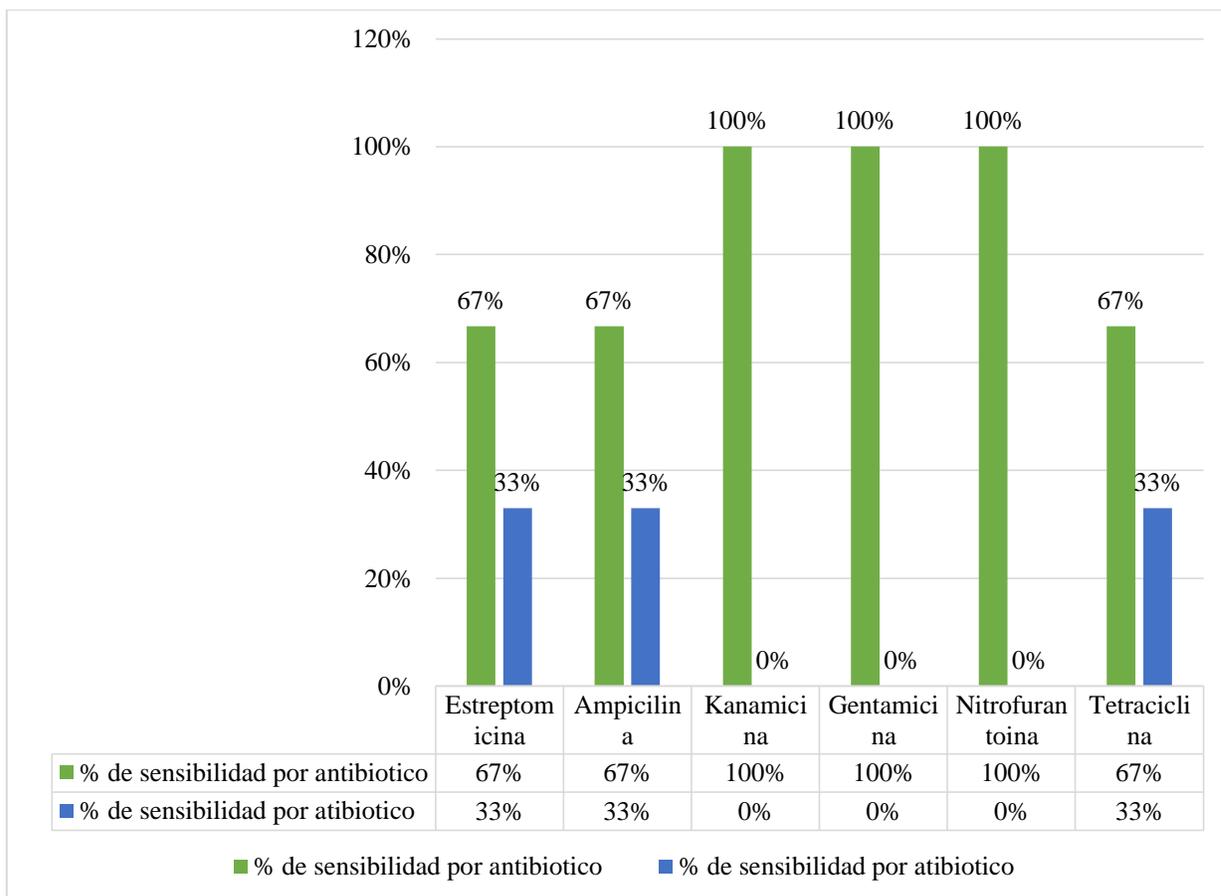


Gráfico 3.3: Porcentaje de resistencia y sensibilidad de *Escherichia coli* frente a 6 antibióticos

En la tabla podemos apreciar que los antibióticos a los que las cepas de *Escherichia coli* presentaron una resistencia fueron la Estreptomina con un 33,3 % (1/3), Ampicilina con un 33,3 % (1/3) y la Tetraciclina también con un 33,3 % (1/3) respectivamente, mientras que la susceptibilidad la demostraron la Kanamicina, Gentamicina y Nitrofurantoina. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede mencionar que el antibiótico mayormente empleado inadecuadamente por parte de los ganaderos es la ampicilina, antimicrobiano perteneciente al grupo de los betalactámicos e indicado para tratar la infección de la glándula mamaria. Congalo L, 2013 efectuó un estudio nacional en el que se revela la existencia del 48,5% de mastitis bovina en ganado.

En un estudio publicado por Martínez D, et al., 2013 se hace referencia a que *E. coli* aislado de vacas con mastitis mostró elevadas resistencias a tetraciclina (92%), estreptomina (90%), y amikacina (86%) y se evidenció resistencia a múltiples fármacos. (Martínez, 2013).

En otro estudio de Faría, et al., 1998 detectaron la presencia de antibióticos en 48 de 416 muestras de leche, aislándose de éstas 75 Enterobacterias siendo 17 de ellas *Escherichia coli*, bacteria que mostró resistencia a tetraciclina (40%), ampicilina (20%), nitrofurantoína (6,6%) y sensibilidad frente a gentamicina y estreptomina (Faría, 2005)

Aponte., et al., 2007, para evaluar la sensibilidad a antibióticos se emplearon 371 muestras de leche cruda de las cuales se aisló *E. coli* en un 3.8%. Los porcentajes de resistencia de *Escherichia coli* a los antibacterianos fue mayor al actual estudio, es así que se demostró 100% de resistencia ante estreptomina, 86% para ampicilina, 57% a kanamicina, 50% frente a tetraciclina y una elevada sensibilidad a gentamicina, nitrofurantoína y penicilina siendo del 93%. El autor nos dice que la resistencia y multiresistencia en este trabajo fue elevada lo que refleja el uso indiscriminado de antimicrobianos por el escaso o nulo control en lo referente a esta problemática. (Aponte, 2007)

3.1.9. Antibiograma de *Staphylococcus aureus*

Tabla 4.3: Porcentaje de resistencia y sensibilidad de *Staphylococcus aureus* frente a 7 antibióticos.

Muestras	Discos de Antibióticos						
	Eritromicina 15 mcg	Penicilina 10 U	Ciprofloxacino 5 mcg	Amikacina 30 mcg	Tetraciclina 30 mcg	Clindamicina 2 mcg	Cefoxitin
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S
% de sensibilidad por antibiótico	100%	0%	100%	100%	100%	100%	100%
% de sensibilidad por antibiótico	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%

Realizado por: Jhonatan Granizo

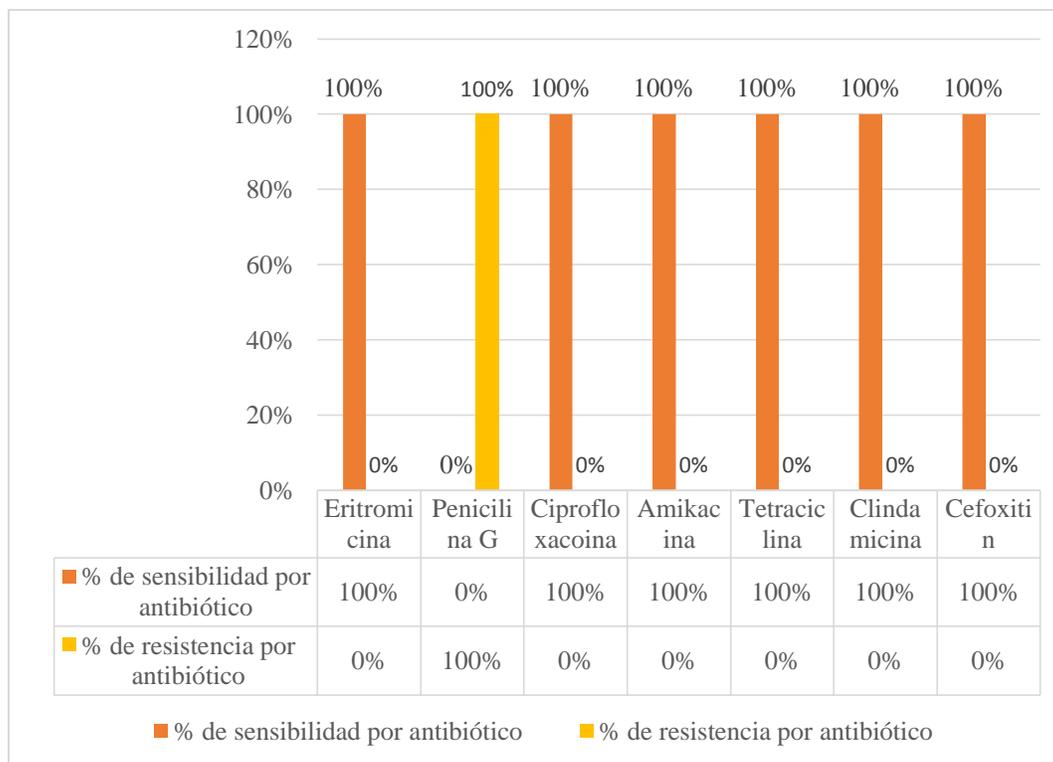


Gráfico 4.3: Porcentaje de resistencia y sensibilidad de *Staphylococcus aureus* frente a 7 antibióticos.

En la tabla podemos observar que de todas las 8 muestras de leche cruda solamente la Penicilina mostro un 100 % de resistencia en todos los casos. Este resultado lo podemos respaldar con el trabajo de investigación de Faría J, et al., 1999 en el estado de Zulia-Venezuela al evidenciar que de 45 cepas aisladas 15 pertenecientes a *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a penicilina y en el año de 2005 en otro estudio realizado por el mismo autor el cual trataba acerca de la sensibilidad a antimicrobianos de agentes patógenos mastitogénicos, se reportó que uno de los antibióticos al que *Staphylococcus aureus* demostró la mayor resistencia (13,63%) fue a penicilina, pero también existió resistencia frente a tetraciclina y eritromicina. (Faría, 2005)

Los otros antibiótico presentaron sensibilidad en este caso frente a amikacina, cefoxitina, ciprofloxacina, eritromicina, clindamicina y tetraciclina, estos datos son respaldado por el artículo de Valero, et al., 2010 al mostrar la prevalencia de sensibilidad del 100% ante cefoxitina, 95,1% a ciprofloxacina, 96,3% a eritromicina, 97,5% a clindamicina y 98,8% a tetraciclina. (Valero & al., 2010)

Respecto a amikacina se demostró sensibilidad del 93,33% en el trabajo publicado por Faría, J., et al., 1999, manteniendo relación con la investigación presente. (Faria & al., 1999)

El estudio de Arreces G., 2015 demostró en sus análisis que un bajo porcentaje de muestras de leche cruda de vaca equivalente al 6,67% (4/60) con presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a penicilina G. (Arreces, 2015)

Entre otras investigaciones podemos mencionar a por Martínez, D., et al., 2013 basada en identificar las bacterias causantes de mastitis y la presencia de resistencia a algunos antibacterianos. Uno de los microorganismos que producen la infección fue *Staphylococcus aureus* el cual igualmente que en las otras investigaciones mostró resistencia a penicilina G. (Martínez, 2013)

En otro estudio realizado a nivel nacional por Cholca S, et al., 2012, sobre los antibióticos empleados en ganado productor de leche se expone que una de las familias de antibióticos empleados con mayor frecuencia corresponde a los betalactámicos (39%) grupo dentro del cual se encuentra la penicilina, manifestándose además que ya existe evidencia de resistencia a este grupo de medicamentos. (Colcha, 2012)

En otro estudio Pérez N. et al., 2010, tamizaron 29.451 estudios de microbiología y se encontraron 976 aislamientos de *S. aureus*, los cuales se analizaron para determinar su resistencia a los antibióticos por el método de microdilución en caldo. El 49,6 % de ellos (484) fueron clasificados como resistentes a la meticilina; se encontró un mayor grado de resistencia múltiple, especialmente para gentamicina (25,0% Vs. 2,9%), ciprofloxacina (25,1% Vs.2,4%), clindamicina (29,4% Vs.4,1%) y eritromicina (31,0% Vs.1,7%), y menor, para trimetoprim/sulfametoxazol (11,8% Vs.4,1%). (Pérez, 2010)

Un reciente informe de la OMS estableció claramente que la resistencia de las bacterias comunes a los antibióticos ha alcanzado niveles alarmantes en muchas partes del mundo. Por ejemplo, en Europa se ha producido un aumento de la resistencia a los principales antibióticos por parte de bacterias comunes, como la *Escherichia coli*, que provoca, entre otras, infecciones del tracto urinario, el *Staphylococcus aureus* (SARM, el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina), la *Klebsiella pneumoniae* y la *Pseudomonas aeruginosa*. (OMS, 2014)

También nos dice que el primer obstáculo son las importantes lagunas en la vigilancia de la resistencia a los antibióticos. En 2001, la OMS y el Consejo de la Unión Europea publicaron estrategias y directrices internacionales para ayudar a los países a establecer sistemas de control de la resistencia a los antibióticos y aplicar medidas eficaces, entre ellas campañas de sensibilización pública. Hoy en día, las preocupaciones más inmediatas y urgentes se refieren a la resistencia de las bacterias comunes a los antibióticos. (OMS, 2014)

En consonancia con la OMS, el ECDC considera que hay tres ámbitos estratégicos de intervención que deben tener prioridad, y que cada uno puede desempeñar un papel importante: (ECDC, 2014)

- Uso prudente de los antibióticos disponibles y, cuando sea posible, prevención de infecciones mediante programas de vacunación adecuados;
- Medidas higiénicas para el control de la transmisión cruzada de cepas resistentes entre personas, tales como reconocimientos preventivos para detectar dichas cepas y aislamiento de los pacientes portadores;
- Investigación y desarrollo de antibióticos con mecanismos de acción novedosos (ECDC, 2014)

CONCLUSIONES

- La leche cruda que fue analizada no cumple con la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 009. Leche cruda .Requisitos; ya que la presencia de bacterias patógenas de los géneros que fueron investigados (*Staphylococcus*, *Escherichia*) nos sugiere que la calidad sanitaria es deficiente, constituyendo un riesgo para la salud del consumidor.
- La cantidad de bacterias patógenas de los géneros investigados (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) en el presente trabajo, es alta Y sobrepasaron los límites máximos permitidos en el Reglamento Técnico RTCR; 401-2006, por lo que se puede concluir que la leche cruda bovina procedente de Tunshi y San Andrés tiene una calidad sanitaria deficiente, además se presume que existe poco uso de Buenas Prácticas a lo largo de la cadena agroalimentaria de la leche expendida, constituyendo un grave problema de salud pública.
- Debido a que la alta presencia de bacterias en la leche cruda analizada ,es de mucha importancia y a la vez necesario el control y mejoramiento de sistemas de producción, transporte y almacenamiento de leche cruda, mediante capacitaciones y seguimiento durante toda la cadena láctea, implementados tanto las autoridades como el organismo regulador competente.
- Las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* presentaron resistencia a penicilina y sensibilidad frente a ciprofloxacino, clindamicina, amikacina, tetraciclina y eritromicina.
- Las cepas aisladas de *Escherichia coli* mostraron resistencia frente a ampicilina, estreptomina y tetraciclina, resultando sensibles frente a gentamicina, nitrofurantoína, y kanamicina. Los antibióticos usados frecuentemente de manera inadecuada por parte de los ganaderos para prevenir o tratar infecciones que afectan al ganado productor de leche, pertenecen al grupo de los betalactámicos.
- No hubo crecimiento de la bacteria *Brucella abortus* por lo que podemos decir que la leche procedente de estos lugares está libre de dicha bacteria patógena.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar muestreo durante toda cadena láctea, de manera que se encuentre los lugares de mayor contaminación, o abarcando la mayor población posible, en el que se dé una visión clara de la calidad microbiológica de la leche en Tunshi y San Andres, tomando este estudio como base; además se podría realizar un estudio incidencia y prevalencia de estas bacterias en la región, de manera que se relacione con la cantidad de patógenos encontrados y la enfermedades transmitidas por alimentos para encontrar si las personas desarrollaron inmunidad a tales bacterias patógenas..

- Se deben realizar capacitaciones generalizadas en buenas prácticas al personal encargado en el manejo manipulación producción, venta, almacenamiento, la rutina de ordeño para disminuir las cargas microbiológicas, cumplir con las normas establecidas y asegurar la salud del consumidor.

- Instruir a productores vendedores y consumidores de manera que se asegure el tratamiento adecuado de la leche desde la producción hasta el consumo, así como el acondicionamiento inmediato de las instalaciones de manera técnica para el almacenamiento y venta, todo esto por parte de un profesional en el área.

- Orientar al ganadero en el uso racional de antimicrobianos a través de la ejecución de normas nacionales que expongan los límites máximos permisibles del uso de los antibióticos y su correcta administración.

BIBLIOGRAFÍA

Agrovetmarket, 2014. *AGROVET MARKET ANIMAL HEALTH*. [En línea]
Available at: <http://www.agrovetmarket.com/productos-veterinarios/agrogena-11-gentamicina-antibiotico-amplio-espectro#>
[Último acceso: 10 01 2016].

Alonso, P., 2008. *ESTUDIO COMPARATIVO EN TÉCNICAS DE RECUENTO RÁPIDO EN EL*,
Bogota: s.n.

Alvarez, V., 1995. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica*. Madrid-España: s.n.

Anmat, 2008. *Enfermedades transmitidas por alimentos*. [En línea]
Available at: http://www.anmat.gov.ar/Cuida_Tus_Alimentos/eta.htm
[Último acceso: 11 11 2015].

Anon., s.f. [En línea]
Available at:
<https://books.google.com.ec/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA141&dq=placas+petrifilm&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjC6PiGv6DKAhXChZAKHZpgCEIQ6AEIzAA#v=onepage&q=placas%20petrifilm&f=false>

Aponte, F., 2007. Perfil de resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción.. *Mem. Inst. Investig. Cienc.Salud*, 5(1), pp. 19-25.

Arreces, G. d. C., 2015. *Determinación de la multiresistencia a los antibióticos en cepa de Staphylococcus aureus, aislada de leche cruda de vaca obtenida de una lechería del Departamento de Santa Ana (tesis)*.. [En línea]
Available at: <http://ri.ues.edu.sv/8772/1/16103639.pdf>
[Último acceso: 16 2 2016].

Avila, J. Morales, F. Fernando, P., 2011. *Propiedades Físicas De La Leche*. [En línea]
Available at: <http://caracteristicasfisicoquimicasdlla leche.blogspot.com/>
[Último acceso: 06 11 2015].

Balbero, J., 2011. *Determinación de residuos de antibióticos en la leche de vaca en las plantas procesadoras de productos lácteos en el departamento de sucre*.. [En línea]
Available at:

<http://biblioteca.unisucre.edu.co:8080/dspace/bitstream/123456789/460/1/T636.127%20B172.pdf>

[Último acceso: 02 12 2015].

BD, 2013. *BD Mannitol Salt Agar*. [En línea]
Available at: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>

[Último acceso: 16 2 2016].

BD, 2013. *BD Mueller Hinton II Agar*. [En línea]
Available at: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8774>

[Último acceso: 16 2 2016].

BD, 2013. *Brain Heart Infusion*. [En línea]
Available at: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800>

[Último acceso: 10 02 2016].

Bio-Vet, 2001. *CIPRODEZ ANTIINFECCIOSO BACTERICIDA*. [En línea]
Available at: http://file.biovet.com.br/Bula/Ciprodez/espanhol/bula_ciprodez.pdf

[Último acceso: 5 2 2016].

Bio-Vet, 2001. *CIPRODEZ ANTIINFECCIOSO BACTERICIDA*. [En línea]
Available at: http://file.biovet.com.br/Bula/Ciprodez/espanhol/bula_ciprodez.pdf

[Último acceso: 5 2 2016].

Bogio, J., 2010. *Presencia de antimicrobianos en leche*. [En línea]
Available at: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/leche_subproductos/18-Antimicrobianos.pdf

[Último acceso: 18 11 2015].

Bou, G. O. A. G. C. N. J., 2011. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. [En línea]

Available at:

http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?f=10&pident_articulo=90027188&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=28&ty=134&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=28v29n08a90027188pdf001.pdf

[Último acceso: 29 2 2016].

Britania, 2015. *Brucella Agar Base*. [En línea]
Available at: http://www.britanialab.com/productos/539_hoja_tecnica_es.pdf

[Último acceso: 01 10 2015].

Buñay, Peralta, 2015. *DETERMINACIÓN DEL RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS EN LECHE CRUDA QUE INGRESA A INDUSTRIAS LACTO OCHOA* -, Cuenca-Ecuador: s.n.

Buñay, Peralta, 2015. *DETERMINACIÓN DEL RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS EN LECHE CRUDA QUE INGRESA A INDUSTRIAS LACTO OCHOA* -, Cuenca-Ecuador: s.n.

Castillo, G., 2013. *PREVALENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS Listeria monocytogenes Y Staphylococcus aureus, EN QUESOS FRESCOS ELABORADOS ARTESANALMENTE EN LAS PARROQUIAS RURALES DEL CANTÓN RIOBAMBA.*”, Riobamba: s.n.

Cavalleri, J. Harbeck, R. McCarter, Y. Ortez, J. Rankin, I., 2005. *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. Whashington: Departments of Laboratory Medicine and Microbiology.

Cervantes, E. & al., e., 2002. *Características generales del Staphylococcus aureus*. [En línea] Available at: <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v44n5/14036.pdf> [Último acceso: 15 2 2016].

Chavarrias, M., 2008. *La complejidad microbiológica de la leche cruda*. [En línea] Available at: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2008/12/03/181883.php> [Último acceso: 05 11 2015].

CODEX, 2006. *Leche y Productos lacteos*. [En línea] Available at: <http://www.codexalimentarius.org/codex-home/es/> [Último acceso: 1 10 2015].

Colcha, S., 2012. *Análisis de la situación del uso de medicamentos (antibióticos y antiparasitarios) en las unidades productivas de los centros de acopio y enfriamiento de leche Sto. Domingo y Puliza (tesis).*, Sto. Domingo y Puliza: s.n.

D'Pool, G., Torres, T., Rivera, S. & García, A., 2004. *PREVALENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA MEDIANTE ELISA COMPETITIVO EN EL MUNICIPIO LA CAÑADA DE URDANETA ESTADO ZULIA, VENEZUELA*. [En línea] Available at: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/28090/2/art10.pdf> [Último acceso: 15 2 2016].

Diaz, C., 2008. *DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y SULFONAMIDAS EN SEIS MARCAS COMERCIALES DE LECHE DE*, Riobamba: ESPOCH.

Díaz, C., 2008. *DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y SULFONAMIDAS EN SEIS MARCAS COMERCIALES DE LECHE DE*, Riobamba: ESPOCH.

Díaz, C., 2008. *DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y SULFONAMIDAS EN SEIS MARCAS COMERCIALES DE LECHE DE*, Riobamba: s.n.

Dudzinska, N., 2015. *Salud al día*. [En línea] Available at: <http://www.webconsultas.com/brucelosis/brucelosis-humana-1803> [Último acceso: 11 11 2015].

ECDC, E. C. f. D. P. a. C., 2014. *Hoja de información para el público general*. [En línea] Available at: <http://ecdc.europa.eu/es/eaad/antibiotics-get-informed/factsheets/Pages/general-public.aspx> [Último acceso: 29 2 2016].

Ecured, 2016. *Eritromicina*. [En línea] Available at: <http://www.ecured.cu/Eritromicina> [Último acceso: 5 2 2016].

FAO, 2010. *ANTEPROYECTO DE CÓDIGO DE PRÁCTICAS DE HIGIENE PARA LA LECHE*. [En línea] Available at: <http://www.fao.org/docrep/meeting/008/j2308s/j2308s02.htm> [Último acceso: 05 11 2015].

FAO, 2012. *PREVENCIÓN de la E.coli en los ALIMENTOS*. [En línea] Available at: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/fcc/news/FAO_PREVENCION.de.la.E.Coli.en.los.ALIMENTOS_FCC_ES.pdf [Último acceso: 28 2 2016].

Faria. Leal. Pool., 2011. *SENSIBILIDAD A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DE ALGUNOS PATÓGENOS MASTITOGÉNICOS AISLADOS DE LECHE DE CUARTOS DE BOVINOS MESTIZOS DOBLE PROPÓSITO*. *FCV-LUZ*, 15(3), pp. 227-234.

Faría, J., 2005. *Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito*. [En línea] Available at: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/28313/2/art5.pdf> [Último acceso: 16 2 2016].

Faria, J. & al., e., 1999. *Resistencia a los antimicrobianos de Staphylococcus aislados de leche cruda.* [En línea]

Available at: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27202/2/articulo12.pdf>
[Último acceso: 16 2 2016].

Faria, J. R. Z. G. B. G. A., 1998. *Resistencia de los antimicrobianos y concentracion inhibitoria minima de enterobacterias aisladas de leche cruda.* [En línea]

Available at: <file:///C:/Users/USUARIO/Desktop/articulo4.pdf>
[Último acceso: 29 2 2016].

FDA, 2015. *FDA.* [En línea]

Available at: <http://www.fda.gov>
[Último acceso: 14 10 2015].

FDA, 2015. *Los peligros de la leche cruda: La Leche sin Pasteurizar Puede Representar un Riesgo Grave Para la Salud.* [En línea]

Available at: <http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/Consumers/ucm210577.htm>
[Último acceso: 06 11 2015].

Federación internacional de lechería, 2010. *Adulterantes en leche.* [En línea]

Available at: <http://www.docstoc.com/docs/110949891/Adulterantes-en-leche>
[Último acceso: 06 12 2015].

Fernández, A., García, C., Saéz, J. & Valdezate, S., 2010. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio. Procedimientos en Microbiología Clínica.* 37 ed. España: s.n.

Galli, 2012. Estudio de los factores de adherencia de cepas de Escherichia Coli productoras de toxina Shiga aisladas de bovinos. p. 119.

Ganadera, E. P. d. A., 2015. *Actualidad Ganadera.* [En línea]

Available at: <http://www.actualidadganadera.com/articulos/manejo-leche-conservar-su-calidad-despues-del-ordeno.html>
[Último acceso: 05 11 2015].

Gimferrer, N., 2013. *Cómo prevenir Shigella en alimentos.* [En línea]

Available at: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2013/01/09/215265.php>
[Último acceso: 29 2 2016].

Gonzales, H., 2010. *propiedades físicas de la leche*. [En línea] Available at: <http://fisicadelaleche.blogspot.com/> [Último acceso: 06 11 2015].

González, F., 2003. *Los riesgos microbiológicos*. [En línea] Available at: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2001/12/04/568.php> [Último acceso: 26 09 2015].

INEC, 2013. *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*. [En línea] Available at: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac%202013/PRESENTACIONESPAC2013.pdf [Último acceso: 05 11 2015].

INEN, N., 2012. *LECHE CRUDA. REQUISITOS.* [En línea] Available at: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0009.2008.pdf> [Último acceso: 25 09 2015].

INS, 2011. *IDENTIFICACIÓN DE RIESGOS QUÍMICOS ASOCIADOS AL CONSUMO DE LECHE CRUDA BOVINA EN COLOMBIA*. [En línea] Available at: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-peligros-quimicos-en-leche.pdf> [Último acceso: 15 11 2015].

Llop, A. Z. L., 2001. *Microbiología y Parasitología medica*. 1 ed. Cuba: Ciencias Medicas.

Lucero, O., 2013. Capítulo IV de Leche y derivados.. En: Riobamba: s.n., pp. 39-102.

Lugo. A, R. J. M. L. A. F., 2010. *RESPYN*. [En línea] Available at: http://www.respyn.uanl.mx/xi/4/articulos/aislamiento_de_cepas.htm [Último acceso: 16 2 2016].

M Ortega, S Valdezate, 2013. Diversidad Genética de Brucella en España. *Semaforo*, Issue 55, pp. 38-44.

Macfaddin, J., 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Tercera ed. Montevideo-Uruguay: Editorial Médica Panamericana S.A.

MAGAP, 2015. *Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca*. [En línea]
Available at: <http://www.agricultura.gob.ec/programas-y-servicios/>
[Último acceso: 16 10 2015].

Magariños, H., 2008. *Producción higiénica de leche*. [En línea]
Available at: http://www.science.oas.org/oea_gtz/LIBROS/LA_LECHE/leche_all.pdf
[Último acceso: 02 12 2015].

Mariscal, P., 2013. *Características Microbiológicas de Leche Cruda de Vaca en Mercados de Abasto de Trinidad Bolivia*. [En línea]
Available at: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2307-96062013000200002&script=sci_arttext&tlng=es
[Último acceso: 15 2 2016].

Martinez , Gomez, 2013. Calidad Composicional e Higiénica de la leche cruda recibida en Industrias Lácteas de Sucre, Colombia.. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2).

Martínez, A., 2015. *Calidad e inocuidad en leche cruda de una cadena de producción de una provincia occidental de Cuba*.. [En línea]
Available at: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2015000200002&script=sci_arttext
[Último acceso: 15 2 2016].

Martínez, D., 2013. *Resistencia de las bacterias causantes de mastitis bovina frente a los antimicrobianos más frecuentes*. [En línea]
Available at: <file:///C:/Users/Marilin/Downloads/273-1111-1-PB.pdf>
[Último acceso: 16 02 2016].

Máttar, S. Calderón, A.Sotelo, D. Sierra M., 2009. Detección de Antibióticos en Leches:Un Problema de Salud Pública. *Rev. salud pública.*, 11(4), p. 580.

Mediaumh, 2013. *Oxidasa*. [En línea]
Available at: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice/identificacion-bacteriana/oxidasa>
[Último acceso: 16 2 2016].

Meza, A. R. D. Á., 2013. *PRINCIPIOS BÁSICOS DE*. 1 ed. EEUU: palibrio.

Microdonto, 2009. *Morfología-de-las-colonias-bacterianas*. [En línea]
Available at: <https://microdonto.files.wordpress.com/morfologia-de-las-colonias-bacterianas.pdf>
[Último acceso: 12 11 2015].

MicrogenTM, 2004. *Microgen Bioproducts*. [En línea]
Available at: <http://www.medica-tec.com/chi/files/MICROGEN-GN-ID-MID64-641-65..pdf>
[Último acceso: 6 12 2015].

MicrogenTM, 2007. *MicrogenTM GnA+B-ID System*. [En línea]
Available at: <http://www.medica-tec.com/arg/files/MICROGEN-GN-ID-MID65%20y%20MID641.pdf>
[Último acceso: 25 1 2016].

Moreno, F., 2007. 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). *Revista de Medicina Veterinaria*, 14(<http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/1802>).

MSP, 2014. *Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica*. [En línea]
Available at: <http://www.salud.gob.ec/direccion-nacional-de-vigilancia-epidemiologica/>
[Último acceso: 05 11 2015].

NTE INEN.1529-2, 1999. *Control Microbiológico de los Alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico..* s.l.:s.n.

OMS, 2014. *El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo*. [En línea]
Available at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>
[Último acceso: 30 09 2015].

Ortega, M., 2007. *Densidad de la Leche*. [En línea]
Available at: <http://densileche.blogspot.com/>
[Último acceso: 06 11 2015].

Osorio, J., 2010. *Brucelosis bovina Prevención, diagnóstico y control*. [En línea]
Available at: [http://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Enfermedades-Animales/Brucelosis-Bovina-\(1\)/Brucelosis-Bovina4.aspx](http://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Enfermedades-Animales/Brucelosis-Bovina-(1)/Brucelosis-Bovina4.aspx)
[Último acceso: 16 02 2016].

- Pérez, P., 2010. *Resistencia de Staphylococcus aureus a los antibióticos en un hospital de la orinoquia.* [En línea]
 Available at: http://ac.els-cdn.com/S0123939210701089/1-s2.0-S0123939210701089-main.pdf?_tid=5f85b984-e015-11e5-a277-00000aacb35e&acdnat=1456881990_91475694e60ab4b536ff8e2483f06a7a
 [Último acceso: 29 2 2016].
- PEV, 2016. *Prontuario de Especialidades Veterinarias. Clindamicina.* [En línea]
 Available at: <http://www.diccionarioveterinariopl.m.com/clindamicina-1545-2>
 [Último acceso: 5 2 2016].
- Prast, G., 2005. *Microbiología Clínica.*. España-Madrid: Médica Panamericana,.
- Reyes, Villaroel, 2006. Brucelosis en un escolar. *Chil Infect*, pp. 351-358.
- Rodríguez, E., Ordonez, P. & Sanchez, L., 2012. *SITUACIÓN DE LA BRUCELOSIS HUMANA EN ESPAÑA.* [En línea]
 Available at: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/761-1148-1-PB.pdf>
 [Último acceso: 15 2 2016].
- Rodríguez, A., 1998. *Tetraciclinas.* [En línea]
 Available at: http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act11198.pdf
 [Último acceso: 5 2 2016].
- Rodríguez, G., 2002. *Principales características y diagnósticos de los grupos patógenos de Escherichia coli.* *Salud Pública Mex.* [En línea]
 Available at: <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v44n5/14036.pdf>
 [Último acceso: 15 2 2016].
- Rodríguez, J., 2005. *Los riesgos de las intoxicaciones por estafilococos - See more at:* <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2005/03/16/17224.php#sthash.iYWgiwpe.dpuf> [En línea]
 Available at: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2005/03/16/17224.php>
 [Último acceso: 28 02 2016].
- RTCR, R. T., 2006. *Leche cruda y Leche Higienizada.* s.l.:s.n.
- Ryan KJ, Ray CG, 2004. *Sheris Medical Microbiology.* 4th ed. ed. s.l.:McGraw Hill.

Ryan, K., 2004. Sherris Medical Microbiolog. En: *Sherris Medical Microbiolog.* s.l.:McGraw Hill.

Sabena, G., 2009. *Leche. Producción láctea.* [En línea] Available at: <http://www.mailxmail.com/curso-leche-produccion-lactea/microorganismo-leche-cruda> [Último acceso: 06 11 2015].

Sabena, G., 2009. *Leche. Producción láctea.* [En línea] Available at: <http://www.mailxmail.com/curso-leche-produccion-lactea/microbiologia-leche-cruda> [Último acceso: 18 11 2015].

Salim Máttar, A. C. D. S. M. S. y. G. T., 2009. Detección de Antibióticos en Leches:Un Problema de Salud Pública. *Rev. salud pública.*, 11(4), p. 580.

San Martin, B., 1991. *Estudio de resistencia bacteriana frente a diferentes antibióticos utilizados en mastitis clínica bovina.* [En línea] Available at: <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/6188/6044> [Último acceso: 29 2 2016].

Sanchez, J. G. C. F. C. L., 2008. *EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE ESCHERICHIA COLI EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LA COMUNIDAD.* [En línea] Available at: <http://scielo.isciii.es/pdf/urol/v61n7/02.pdf> [Último acceso: 29 2 2016].

Sanchez, W., 2008. *AREA DE MICROBIOLOGIA CLINICA: PRUEBA BIOQUIMICA DE LA CATALASA INTERPRETACION.* [En línea] Available at: <http://es.scribd.com/doc/8705261/Prueba-de-La-Catalasa#scribd> [Último acceso: 17 2 2016].

Scott, Bailey, 2009. Diagnóstico Microbiológico.. En: 1. ed., ed. *Diagnóstico Microbiológico.* Argentina-Buenos Aires: Médica Panamericana, pp. 80-81.

SENA, 1997. *Derivados Lacteos.* 1 ed. Bogota: s.n.

Signorini, M., 2008. *Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de leche*. [En línea] Available at: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/23640/2/articulo12.pdf> [Último acceso: 15 2 2016].

Silva, M., 2006. *Staphylococcus aureus*. [En línea] Available at: <http://staphylococcus-aureus.blogspot.com/> [Último acceso: 13 01 2016].

Tortora, 2007. *Introducción a la Microbiología*. Novena ed. Buenos Aires, Argentina: Médica panamericana.

Val, D., 2008. *Los antibióticos*. [En línea] Available at: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioAntibioticos.htm> [Último acceso: 28 09 2015].

Valero, K. & al., e., 2010. Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en leche de bovinos con mastitis subclínica y leche de tanque.. *Revista Científica Scielo*, 20(4).

Vergara, D., Torres, M. & Gonzales, F. M. C., 2008. PREVALENCIA DE BRUCELOSIS EN LA LECHE CRUDA DE BOVINOS. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 6(2).

Veterinaria, T., 2012. *Terapia Veterinaria*. [En línea] Available at: <http://www.terapeutiveterinaria.com/antibioticos/aminoglucosidos/amikacina> [Último acceso: 10 1 2016].

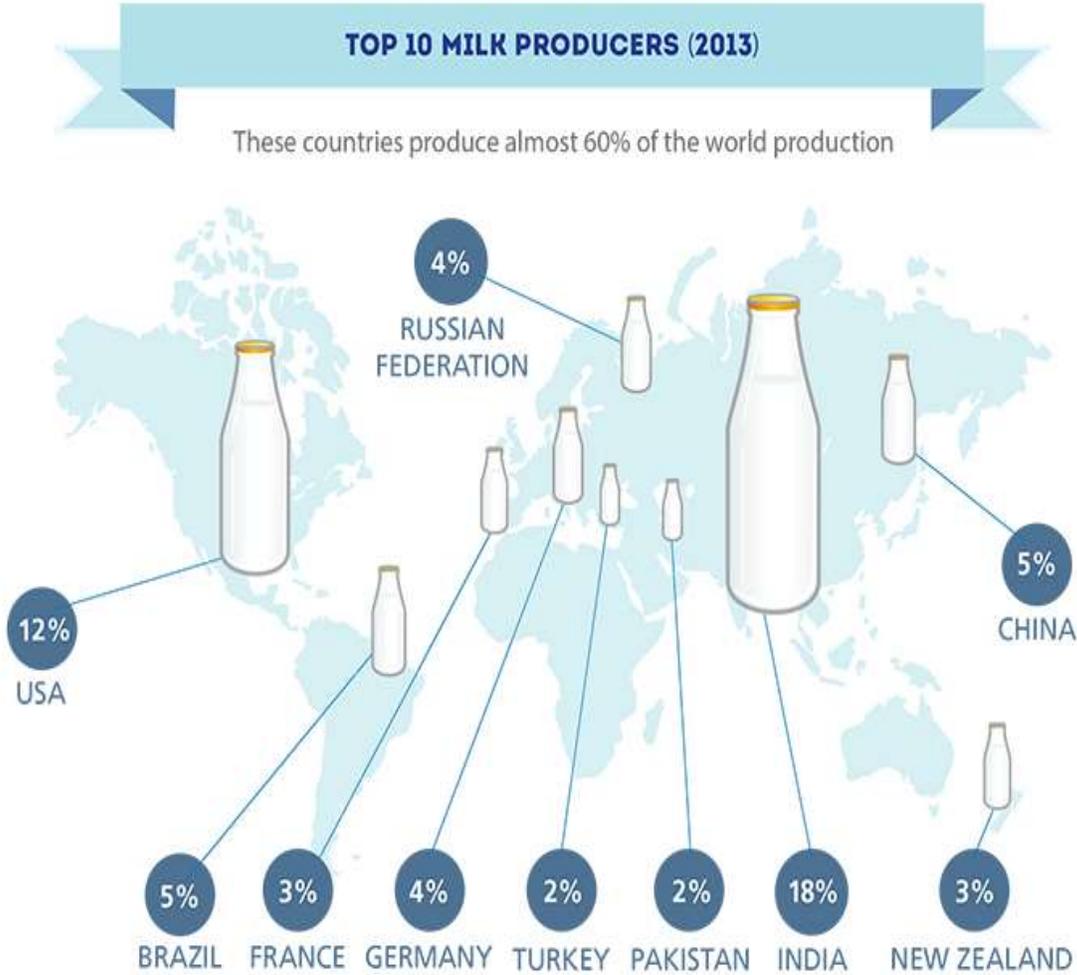
Villaroel, M.; Grell, M. y Saenz, R., 2010. eporte de primer caso humano de aislamiento y tipificación de *Brucella abortus*. *Scielo*, 32(1), p. 2.

VISAVET, 2008. *Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria (yII)*. [En línea] Available at: <http://www.madrimasd.org/blogs/alimentacion/2008/02/08/84070> [Último acceso: 29 2 2016].

Vizcarrondo, Gutiérrez, 2008. *Morfología y Tinción de los Microorganismos*. Venezuela: s.n.

ANEXOS

Anexo A. 10 países con mayor producción en el mundo. Tomado de FAO (2013)



Anexo B: Norma INEN 0004: Leche y Productos Lácteos. Muestreo.

1. OBJETO

1.1 Esta norma establece los procedimientos para la extracción de muestras de leche y productos lácteos.

2. TERMINOLOGIA

2.1 **Partida.** Es la cantidad de material de características similares que satisface totalmente un pedido.

2.2 **Lote.** Es cualquier cantidad de material de características similares, provenientes de una fuente común.

2.3 **Unidad de muestreo.** Es una porción de material o un artículo individual, extraído al azar de un lote.

2.4 **Muestra.** Es el conjunto de unidades de muestreo que se usa como información de la calidad de un lote.

3. DISPOSICIONES GENERALES

3.1 Tamaño de la muestra

3.1.1 En casos de discrepancia o litigio, deberán tomarse las muestras de un mismo lote.

3.1.2 Podrá usarse como unidad de muestreo el contenido total de un envase pequeño destinado a la venta al por menor, en cuyo caso el envase original no deberá abrirse o alterarse.

3.1.3 Para productos envasados en recipientes voluminosos, cada muestra deberá integrarse seleccionando al azar el número de recipientes indicados en la Tabla 1, extrayendo de cada uno de ellos una unidad de muestreo de masa o volumen igual al especificado para cada producto en el capítulo 5.

TABLA 1. Muestreo para unidades voluminosas

Tamaño del lote	Unidades para muestreo
1	1
2 - 5	2
6 - 60	3
61 - 80	4
81 - 100	5
más de 100	*

* 4, más 1 por cada 2 500 unidades adicionales o fracción de tal cantidad.

(Continúa)

3.1.4 Para productos envasados o empacados en recipientes o unidades pequeñas, cada muestra deberá formarse extrayendo al azar el número de unidades o recipientes indicados en la Tabla 2; cada unidad -o envase constituirá una unidad de muestreo (ver 3.1.2).

TABLA 2. Muestreo para unidades pequeñas

Tamaño del lote	Unidades para muestreo
menos de 100	1
101 - 1 000	2
1 001 - 10 000	3
más de 10 000	4
* 4, más 1 por cada 2 500 unidades adicionales o fracción de tal cantidad	

3.2 Condiciones pequeñas al muestreo

3.2.1 Deberá fijarse a cada muestra una tarjeta que incluya un número de identificación y la fecha de muestreo.

3.2.2 Los envases o empaques que contengan las unidades de muestreo deberán sellarse y marcarse con las rúbricas de las partes interesadas, y deberá suscribirse una acta de muestreo que incluya la siguiente información:

- a) número de la norma INEN de referencia: INEN 4;
- b) número de identificación de la muestra,
- c) fecha de muestreo,
- d) nombre del producto y marca comercial,
- e) identificación del lote o de la partida;
- f) masa o volumen total del lote o de la partida;
- g) número de unidades de muestreo obtenidas;
- h) lugar de procedencia del producto,
- i) lugar de toma de las muestras,
- J) observaciones que se consideren necesarias, y
- k) nombres, firmas y direcciones de las partes interesadas.

3.2.3 Las tres muestras deberán destinarse, respectivamente, al fabricante o distribuidor, a un laboratorio de análisis y a la entidad que deba actuar en caso de discrepancia.

3.2.4 La muestra destinada al laboratorio deberá enviarse tan pronto como sea obtenida, tomando precauciones durante el transporte para que no haya exposición directa del producto a la luz y para que la temperatura no sea menor de 0°C ni mayor de 10°C. Cuando las muestras sean destinadas a examen microbiológico, deberá usarse un recipiente aislado que permita mantener una temperatura comprendida entre 0°C y 5°C, excepto en el caso de productos lácteos en conserva envasados en sus recipientes originales, o en el caso de distancias cortas de transporte. Las muestras de queso deberán mantenerse en condiciones que eviten la separación de grasa o humedad, y el queso fresco deberá mantenerse siempre a una temperatura comprendida entre 0°C y

3.2.5 Para resolver en casos de discrepancia, las muestras restantes deberán almacenarse en refrigerador (ver 3.2.6) a una temperatura comprendida entre 0°C y 5°C, durante un tiempo no mayor de siete días si los ensayos no son microbiológicos, y 24 h si son microbiológicos; al cabo de este tiempo las muestras deberán eliminarse adecuadamente.

3.2.6 Podrá añadirse un preservador adecuado a las muestras de productos líquidos o quesos, cuando éstas se destinan a análisis químico o físico, siempre que el mismo no interfiera con el análisis. En tales casos, la naturaleza del preservador y la cantidad añadida deberán indicarse en la etiqueta de la muestra y en cualquier informe relativo al muestreo. No deberán añadirse preservadores a las muestras de productos sólidos o semisólidos (excepto queso) o a las muestras destinadas a ensayos microbiológicos.

3.2.7 Las unidades de muestreo podrán mezclarse antes del análisis o examinarse individualmente, según el criterio del laboratorio de análisis o por solicitud expresa de las partes interesadas.

4. INSTRUMENTAL

4.1 Características generales

4.1.1 El instrumental destinado a tomar muestras para análisis químico, físico o fisicoquímico, deberá estar completamente limpio y seco.

4.1.2 El instrumental destinado a tomar muestras para análisis microbiológico deberá estar completamente limpio y seco; además, deberá esterilizarse mediante uno de los métodos siguientes:

- a) Exposición al aire caliente a 170°C durante 2 horas. Después de esta operación, el instrumental podrá guardarse si se mantiene condiciones estériles.
- b) Exposición al vapor a 120°C, en autoclave, durante 20 min. Después de esta operación, el instrumental podrá guardarse si se mantienen condiciones estériles.
- c) Exposición al vapor a presión atmosférica durante 1,5 horas. Después de esta operación, el equipo deberá usarse el mismo día.
- d) Inmersión al alcohol etílico al 70% (V/V) y exposición a la llama hasta eliminar el alcohol, inmediatamente antes del uso.
- e) Exposición a una llama de gas (propano, butano), inmediatamente antes del uso, de modo que todas las superficies útiles del instrumental entren en contacto con la llama.

La elección del método de esterilización dependerá de la naturaleza, forma y tamaño del instrumental, y de las condiciones del muestreo. Se recomienda emplear, siempre que sea posible, el método a) ó el b).

4.1.3 Los envases destinados a contener muestras líquidas deberán reunir las siguientes características:

- a) ser de vidrio resistente a los métodos de esterilización descritos en 4.1.2;
- b) tener forma y capacidad adecuadas para contener la muestra o la unidad de muestreo y permitir su mezcla mediante agitación;

- c) estar provistos de cierre hermético que evite la contaminación o alteración del producto. El cierre puede ser tapón de caucho o plástico, o tapa roscada de metal inoxidable o plástico, revestida interiormente con un sello de material plástico, impermeable, insoluble, no atacable por las grasas y que no influya en el olor, sabor o composición del producto;
- d) si se usan tapones de caucho, éstos deben cubrirse con un material plástico adecuado antes de colocarlos y presionarlos en el recipiente.

4.1.4 Los envases destinados a contener muestras sólidas o semisólidas deberán reunir las siguientes características:

- a) ser de vidrio o de material plástico resistente a los métodos de esterilización descritos en 4.1.2;
- b) tener boca ancha y capacidad adecuada para recibir y contener la muestra o la unidad de muestreo, y permitir su mezcla mediante agitación;
- c) estar provisto de cierre hermético que evite la contaminación o alteración del producto; el cierre debe ser tapa roscada de metal inoxidable o plástico, revestida interiormente con un sello de material plástico, impermeable, insoluble, no atacable por las grasas y que no influya en el olor, sabor o composición del producto.

4.1.5 El instrumental usado para la mezcla del producto y la extracción de muestras será, preferentemente, de acero inoxidable o aluminio, pero podrá usarse otros materiales adecuados (ejemplo: material estañado). Todas las superficies deberán ser lisas y no presentar hendiduras o salientes. Cuando existan soldaduras, éstas deberán ser capaces de resistir una temperatura de esterilización de 180°C.

4.2 Dispositivos

4.2.1 *Agitador de disco pequeño.* Construido de acuerdo a la figura A.1 para productos contenidos en recipientes de varios litros de capacidad.

4.2.2 *Agitador de disco grande.* Construido de acuerdo con la figura A-2 para productos contenidos en recipientes, tanques o depósitos de gran capacidad.

4.2.3 *Sacamuestras para mantequilla.* Similar al indicado en la figura A.3, de longitud suficiente para atravesar al recipiente que contiene el producto, diagonalmente hasta su base.

4.2.4 *Sacamuestras para queso.* Similar al indicado en la figura A.4 de dimensiones adecuadas al tipo de queso que debe muestrearse.

4.2.5 *Sacamuestras para leche en polvo.* Similar al indicado en la figura A.5. Debe tener un largo comprendido entre 40 y 50 cm y un diámetro exterior de aproximadamente 40 mm, y estar formado por dos tubos concéntricos de aluminio provistos de ranuras que puedan abrirse o cerrarse al girar el tubo interior. El tubo exterior debe terminar en punta para facilitar la penetración.

4.2.6 *Cucharón,* de capacidad no menor de 85 cm³ (ver figura A.6).

4.2.7 *Cucharas,* de acero inoxidable.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Leche y productos lácteos líquidos. (exceptuando la leche condensada y la leche evaporada). Debe aplicarse el siguiente procedimiento:

5.1.1 Mezclar completamente el producto, transvasándolo varias veces de un recipiente a otro, o agitándolo adecuadamente con un agitador de disco (ver 4.2.1 y 4.2.2).

5.1.2 En el caso de muestrear crema, debe usarse uno de los agitadores de disco (ver 4.2.1 y 4.2.2), según el tamaño del recipiente, sumergiéndolo un número suficiente de veces para asegurar una mezcla completa del producto. El agitador debe moverse cuidadosamente para evitar la formación de espuma o el efecto del batido.

5.1.3 Inmediatamente después de la agitación, tomar una unidad de muestreo no menor de 200 cm³ mediante un cucharón y transferirla a un envase adecuado (ver 4.1.4).

5.1.4 Si hay dificultades para homogeneizar el producto, deben mostrarse porciones de diferentes lugares del recipiente hasta totalizar la cantidad requerida.

5.1.5 Si el producto está envasado en recipientes pequeños para la venta, la muestra debe formarse de acuerdo con lo indicado en 3.1.4, y los recipientes no deben abrirse hasta el momento del análisis.

5.2 Leche condensada y leche envasada. Debe aplicarse el siguiente procedimiento:

5.2.1 Si el producto está contenido en recipientes voluminosos, mezclar el contenido del recipiente usando un agitador de disco (ver 4.2.1 y 4.2.2) u otro dispositivo adecuado, cuidando de raspar e incorporar el material adherido a la pared y al fondo del recipiente. Extraer, con un cucharón o un dispositivo adecuado, 2 a 3 litros del producto y transferirlos a un recipiente más pequeño, repetir la agitación, tomar una unidad de muestreo no menor de 200 cm³ y guardarla en un envase adecuado (ver 4.1.4).

5.2.2 Si el producto está envasado en recipientes pequeños para la venta, la muestra debe formarse de acuerdo con lo indicado en 3.1.4 y los recipientes no deben abrirse hasta el momento del análisis.

5.3 Leche en polvo y productos lácteos en polvo. Debe realizarse primero el muestreo para examen microbiológico y luego, sobre el mismo recipiente, el muestreo para análisis químico y examen organoléptico. Deben aplicarse los siguientes procedimientos:

5.3.1 *Muestreo para examen microbiológico.* Usando una cuchara estéril (ver 4.1.2) de acero inoxidable, retirar la capa superior de polvo de la zona de muestreo. Con otra cuchara estéril, tomar una unidad de muestreo de 50 a 200 g. de ser posible de un punto cercano al centro del recipiente. Transferir la porción extraída, tan pronto

(Continúa)

como sea posible y en condiciones asépticas, a un envase estéril adecuado (ver 4.1.4) de color ámbar si es transparente. El envase debe cerrarse inmediatamente. En caso de libigio sobre las condiciones bacteriológicas de la capa superficial del producto, debe tomarse una muestra especial de esta capa.

5.3.2 Muestreo para análisis químico y examen organoléptico. Introducir el sacamuestras para leche en polvo (ver 4.2.3) con velocidad uniforme a través del producto. Cuando el tubo llega al fondo del recipiente, girar el tubo interior para cerrar las ranuras, sacar el aparato y transferir la porción extraída a un envase adecuado (ver 4.1.4). El producto no debe tocarse con las manos, y la operación debe repetirse hasta completar una unidad de muestreo de 300 g a 500 g.

ANEXO C: Normas Microbiológicas de la leche cruda

Anexo C1. Norma INEN 0009. Leche cruda. Requisitos Microbiológicos de la leche cruda tomada en ható.

Requisito	Límite máximo	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aeróbios mesófilos REP, UFC/cm ³	1,5 x 10 ⁵	NTE INEN 1529-5
Recuento de células somáticas/cm ³	7,0 x 10 ⁵	AOAC – 978.26

Anexo C2. Parámetros microbiológicos para leche fluida permitidos en leche que se comercializa directamente para el consumo humano.

Parámetro	Plan de muestreo			Límite	
	Clase	n	C	m	M
Coliformes totales	3	5	2	500UFC/ml	2000UFC/ml
Salmonella spp/25 g	2		0		Ausencia
Listeria monocytogenes/25 g	2		0		Ausencia
Staphylococcus aureus	3		2	100UFC/ml	500UFC/ml
coliformes fecales	3		2	10 UFC/ml	100 UFC/ml

Anexo D. Requisitos fisicoquímicos de la leche cruda. Tomado de Norma técnica ecuatoriana 9.

Leche cruda. Requisitos

REQUISITOS	UNIDAD	MIN.	MAX.	MÉTODO DE ENSAYO
Densidad relativa: a 15 °C A 20 °C	-	1,029 1,028	1,033 1,032	NTE INEN 11
Materia grasa	% (fracción de masa) ⁴	3,0	-	NTE INEN 12
Acidez titulable como ácido láctico	% (fracción de masa)	0,13	0,17	NTE INEN 13
Sólidos totales	% (fracción de masa)	11,2	-	NTE INEN 14
Sólidos no grasos	% (fracción de masa)	8,2	-	*
Cenizas	% (fracción de masa)	0,65	-	NTE INEN 14
Punto de congelación (punto crioscópico) **	°C °H	-0,536 -0,555	-0,512 -0,530	NTE INEN 15
Proteínas	% (fracción de masa)	2,9	-	NTE INEN 16
Ensayo de reductasa (azul de metileno)***	h	3	-	NTE INEN 018
Reacción de estabilidad proteica (prueba de alcohol)	Para leche destinada a pateurización: No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 68 % en peso o 75 % en volumen; y para la leche destinada a ultrapasteurización: No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 71 % en peso o 78 % en volumen			NTE INEN 1500
Presencia de conservantes ¹⁾	-	Negativo		NTE INEN 1500
Presencia de neutralizantes ²⁾	-	Negativo		NTE INEN 1500
Presencia de adulterantes ³⁾	-	Negativo		NTE INEN 1500
Grasas vegetales	-	Negativo		NTE INEN 1500
Suero de Leche	-	Negativo		NTE INEN 2401
Prueba de Brucelosis	-	Negativo		Prueba de anillo PAL (Ring Test)
RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS ⁵⁾	ug/l	----	MRL, establecidos en el CODEX Alimentarius CAC/MRL 2	Los establecidos en el compendio de métodos de análisis identificados como idóneos para respaldar los LMR del codex ⁶⁾

ANEXO E: Almacenamiento y uso de Placas Petrifilm

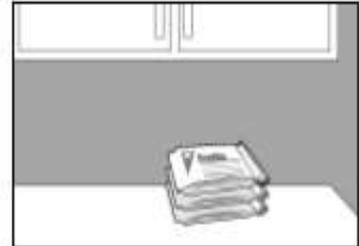
Almacenamiento



1 Almacene los paquetes cerrados a una temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$ ($\leq 46^{\circ}\text{F}$). Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente del lugar de trabajo antes de abrirlas. Las Placas Petrifilm tienen un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración. Observe la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.



2 Para cerrar un paquete abierto, doble el extremo y sellelo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.



3 Mantenga los paquetes cerrados (según se indica en el punto 2) a temperatura $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ($\leq 77^{\circ}\text{F}$) y una humedad relativa $\leq 50\%$. No refrigere los paquetes que ya hayan sido abiertos. Utilice las Placas Petrifilm máximo 1 mes después de abierto el paquete. Para almacenamiento prolongado de paquetes abiertos, una vez cerrados (según punto 2) colóquelos en un contenedor sellable (tipo funda con cierre) y almacénelos en congelación. Para usar las placas, saque el paquete del congelador, retire el número de placas necesarias y guarde el resto en las mismas condiciones antes descritas hasta su fecha de caducidad.

Preparación de la muestra



4 Prepare al menos una dilución de 1:10 de la muestra. Pese o pipeteo la muestra en una funda o bolsa de Stomacher, botella de dilución o cualquier otro contenedor estéril apropiado.



5 Adicione la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/L de KH_2PO_4 y con pH ajustado a 7.2); agua de peptona al 0.1%; diluyente de sal peptonada (método ISO 6887); buffer de agua de peptona (método ISO 6579); solución salina (0.85 a 0.90%); caldo letheen libre de bisulfato o agua destilada.

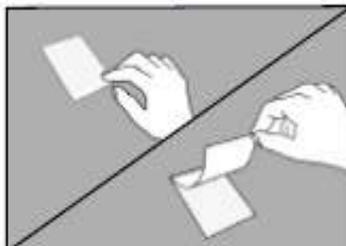


6 Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales.

Ajuste el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2. Para productos ácidos: use solución 1N de NaOH . Para productos básicos: use solución 1N de HCl .

No utilice buffers que contengan citrato, bisulfito o bisulfato de sodio, porque pueden inhibir el crecimiento.

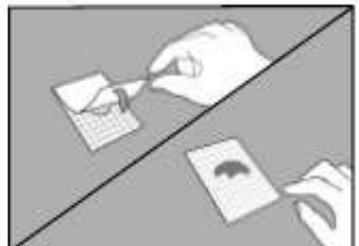
Inoculación



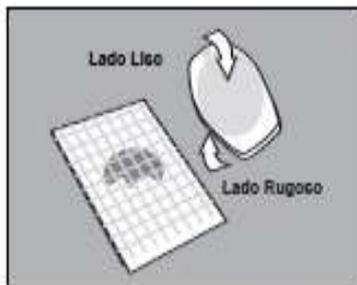
7 Coloque la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levante la lámina semitransparente superior.



8 Con la pipeta perpendicular a la Placa Petrifilm, coloque 1 ml de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.



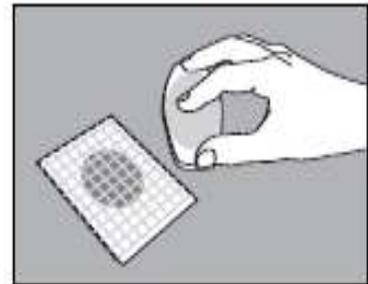
9 Libere la película superior dejando que caiga sobre la dilución. No la deslice hacia abajo.



10 Con el lado rugoso hacia abajo, coloque el dispensador o esparcidor sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.

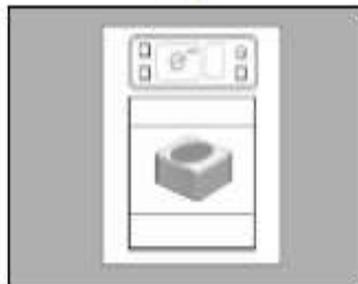


11 Presione suavemente el dispensador o esparcidor para distribuir la muestra sobre el área circular. No gire ni deslice el dispensador. Recuerde distribuir la muestra antes de inocular una siguiente placa.



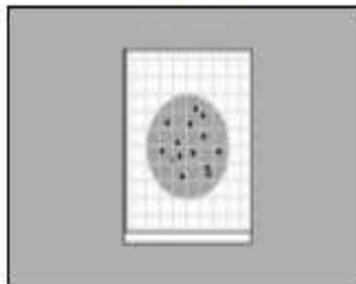
12 Levante el dispensador o esparcidor. Espere por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y proceda a la incubación.

Incubación



13 Incube las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

Interpretación



14 Las Placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Consulte la Guía de interpretación para leer los resultados.



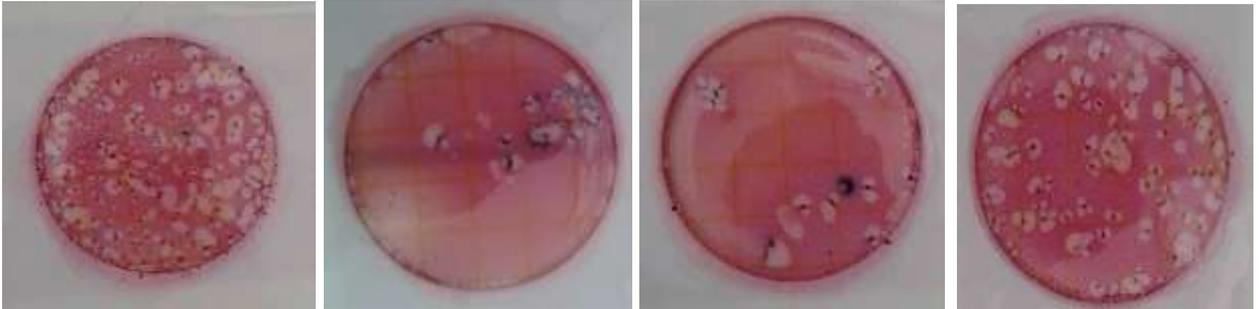
15 Las colonias pueden ser aisladas para su identificación posterior. Levante la película superior y recoja la colonia del gel.

Anexo F: Antibióticos más empleados en medicina veterinaria

GRUPO	ANTIBIÓTICO	PREPARADO COMERCIAL	INDICACIONES
Betalactámicos	Cefoperazona	Fortiperazone	mamitis
	Cefalexina	Rilexine tratamiento	mamitis
	Amoxicilina	Synulox LC	mamitis
	Cloxacilina	Bovigam lactación	mamitis
	Ampicilina	Bovigam lactación	mamitis
	Penetamato iohidrato	Mamyzin inyector	mamitis
	Bencilpenicilina	Tetra Delta	mamitis
	Cefquinoma	Cobactan LC	mamitis
Sulfamidas	Sulfadoxina, trimetoprim	Veterin Diftrim 24	Inf. respiratorias genitourinarias enteritis bacter.
	Sulfadimidina trimetoprim	Sulfatrimetoprim Bayer	Inf. respiratorias genitourinarias enteritis bacter.
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Terramicina 100 si	mamitis, metritis, neumonias...
	Tetraciclina	Tetravex si	neumonias, pastereiosis...
Aminoglucósidos	Neomicina	Lincocin forte	mamitis
	Gentamicina	Gentamox	neumonias, diarreas, mamitis
	Kanamicina	Mamispra forte	mamitis
Lincosamidas	Lincomicina	Lincocin forte	mamitis
Macrólidos	Eritromicina	Eritroyet	cojeras, neumonias, mamitis
	Espiramicina	Mycogal 105	artritis, SRB, pielonefritis
	Tilosina	Tilosina 200	cojeras, metritis,artritis

ANEXO G: Análisis microbiológico de *Escherichia coli*

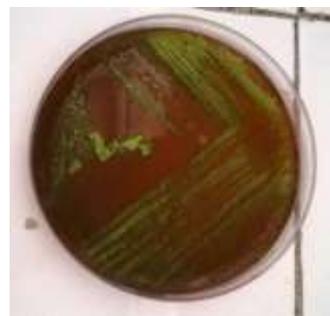
Crecimiento de *Escherichia coli* en muestras de leche cruda en placas Petrifilm



Prueba de la Oxidasa

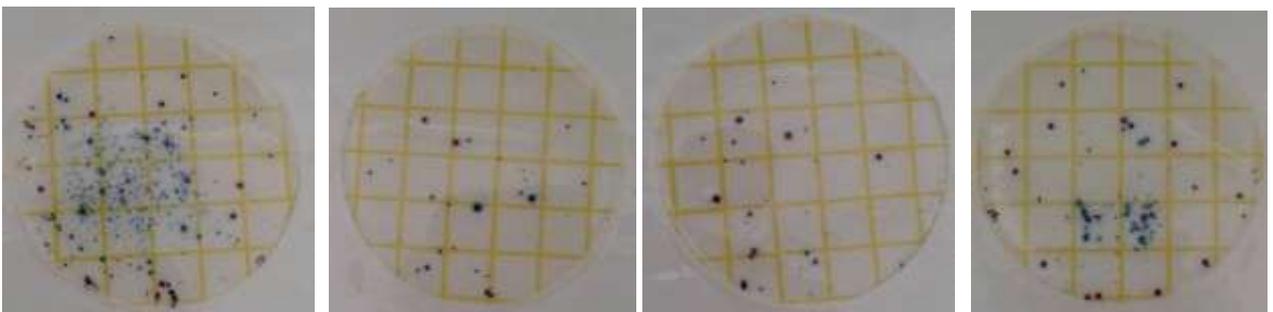


Crecimiento de *E.coli* en agar eosina azul de metileno



ANEXO H: Análisis microbiológico de *Staphylococcus aureus*

Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en placas Petrifilm



Fermentación del manitol



Prueba de la Catalasa



ANEXO I: Pruebas en el kit Microgen Identification System



ANEXO J: Antibiograma

Halos de inhibición de *Staphylococcus aureus*



Halos de inhibición de *E.coli*

