

no/a.

AUTOR

AÑO



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

IDENTIFICACIÓN DE PRESENCIA DE *Staphylococcus* Y ANTIBIÓTICOS
MEDIANTE CULTIVOS BACTERIANOS Y TIRAS REACTIVAS EN LECHE
CRUDA DE BURRA, COMERCIALIZADA EN EL SUR DE QUITO.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Médico Veterinario y Zootecnista.

Profesor Guía

David Francisco Andrade Ojeda

Autor

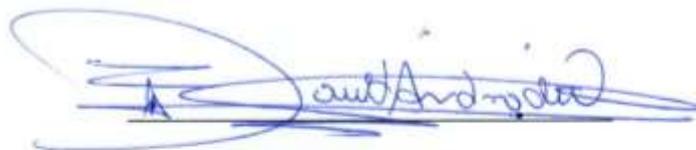
Steven David Ramírez Pérez

Año

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido este trabajo, Identificación de presencia de *Staphylococcus* y antibióticos mediante cultivos bacterianos y tiras reactivas en leche cruda de burra, comercializada en el sur de Quito, a través de reuniones periódicas con el estudiante Steveen David Ramírez Pérez, en el semestre 2020-10, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



David Francisco Andrade Ojeda
Médico Veterinario Zootecnista MgSc. Tecnología de Alimentos
CI: 1712693165

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Identificación de presencia de *Staphylococcus* y antibióticos mediante cultivos bacterianos y tiras reactivas en leche cruda de burra, comercializada en el sur de Quito de Steven David Ramírez Pérez, en el semestre 2020-10 dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Juan José Pesantez Valdivieso
Médico Veterinario Zootecnista
Cí: 1716395791

DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes".

A handwritten signature in blue ink, reading "Steven David Ramirez Pérez", is written over a horizontal line.

Steven David Ramirez Pérez
CI: 1724222847

AGRADECIMIENTOS

En el camino de mi proceso formativo estuvieron involucradas un gran número de personas que estimo enormemente. Personas que aportaron su tiempo y esfuerzo, tal como lo fue el caso de mi tutor, Dr. David Andrade, quién encaminó este estudio para ser alcanzado.

De igual manera, quiero agradecer a toda mi familia, a mis tíos y primos; quienes supieron brindarme el soporte necesario. A mis segundos padres, Mami Rosa y Papi Víctor, por lograr que mi proceso de aprendizaje fuese más tolerable a pesar de todos los inconvenientes y tropiezos que se dieron en el trascurso de estos años de estudio. A mis futuros colegas y amigos, Freddery, Katy y Mateo quienes entre muchos otros, fueron vitales en mi vida y estudio.

Todos y cada uno de ustedes afianzaron mi convicción de que poseer un título o grado de educación no superan la humildad y el respeto que debes expresar por los demás, lo cual va desde mis futuros pacientes, hasta las personas que llegaré a conocer. Por esto y mucho más ¡Gracias totales!

DEDICATORIA

Este trabajo es la cúspide de varios eventos que se dieron gracias al compromiso de mi madre y todos los sacrificios que supo sobrellevar por mí; además de su perseverante anhelo de verme triunfar en el ámbito personal y profesional.

Todo esto confluye en una serie de emociones y sentimientos difíciles de expresar, para lo agradecido que estoy hacia ella. Por tal razón, este trabajo se lo dedico enteramente con mi amor incondicional a mi madre, Julieta.

RESUMEN

La comercialización de leche cruda de burra en las calles de sur de Quito ha ido creciendo gradualmente debido a las creencias sobre las propiedades curativas que se le atribuye. El consumir lácteos sin proceso de pasteurización conlleva varios problemas hacia la salud pública, que inevitablemente llega a afectar a diferentes grupos demográficos de la ciudad. En el presente estudio se estableció como objetivo identificar la presencia de *Staphylococcus* en leche cruda para determinar el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), así como la identificación de residuos para tetraciclina, sulfonamidas y betalactámicos mediante tiras reactivas. Para esto, se realizaron cultivos bacterianos mediante 3M™ Petrifilm™ y tiras reactivas en 40 muestras obtenidas directamente de los comerciales informales. Los resultados obtenidos fueron de 15 muestras positivas a 6 especies distintas de *Staphylococcus* en cultivos 3M™ Petrifilm™ y con resultado negativo para la totalidad de muestras evaluadas para trazas de antibióticos con la prueba TriSensor®. Al evaluar los casos positivos entre los muestreos realizados se evidenció que un 20% en la primera etapa y un 80% en la segunda etapa fueron positivos al muestreo. Además, mediante un antibiograma se obtuvo que 10.3% de las muestras manifestó resistencia frente a antibióticos como: ampicilina, amoxicilina+ácido clavulánico y tetraciclina, mientras la sensibilidad presentada fue de 89.7% hacia ceftriaxona, cefalexina, ciprofloxacina y enrofloxacin. A pesar de esto las especies de *Staphylococcus* evaluadas demostraron que presentan sensibilidad y resistencia a 11 antibióticos de distintas familias y con mayor predominancia en los fármacos betalactámicos y tetraciclinas, lo que significa que la carga obtenida es limitada para producir un efecto hacia la salud del consumidor. Así mismo el proceso de ordeño pudo verse alterado a factores no contemplados en el estudio debido al desconocimiento de ciertos procesos propios de los productores que derivó en la multiresistencia parcial de ciertos antibióticos hallados en la investigación.

Palabra clave: Leche cruda de burra, multiresistencia, tiras reactivas, Trisensor®, 3M™ Petrifilm, *Staphylococcus*.

ABSTRACT

The sale of raw donkey milk in the streets of the south of Quito has grown gradually, due to the medicinal properties attributed to it. Consuming unpasteurised dairy products entails various problems for public health, which inevitably begins to affect different demographic groups of the city. The objective established in this study was identifying the presence of *Staphylococcus* in raw milk to determine the risk of disease relating foods (foodborne diseases), as well as the identification of residuals for Tetracycline, Sulfonamides and Beta-lactam's by test strips. For this purpose, bacterial culture of 3M™ Petrifilm™ and test strips were used in 40 samples obtained directly from unlicensed vendors. The results obtained were from 15 positive samples to 6 different species of *Staphylococcus* in 3M™ Petrifilm™ cultures, along with a negative result for the total samples evaluated for traces of antibiotics with the TriSensor test. Evaluating the positive cases among the samplings performed shows 20% in the first stage and 80% in the second sampling stage were positive. Moreover, through an antibiogram results obtained show, 10.3% manifested resistance to antibiotics, such as: Ampicillin, amoxicillin + clavulanic acid and Tetracycline, whilst sensitivity to antibiotics shown was 89.7% towards ceftriaxone, cephalexin ciprofloxacin and enrofloxacin. Despite this, the species of *Staphylococcus* evaluated, demonstrate that they present sensitivity and resistance to 11 antibiotics from distinct families, most predominant in beta-lactam drugs and Tetracyclines, which means that the sample obtained is limited in producing an effect to the health of consumer. Likewise, the milking process could have altered factors that are not contemplated in the study due to the ignorance of the producers during this proceeding., this can effect in the partial multiresistance of certain antibiotics found in the investigation.

Key words: Raw donkey milk, multi resistance, test strips Trisensor®, 3M™ Petrifilm, *Staphylococcus*.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Problema	2
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos	3
1.4 Hipótesis.....	3
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	4
2.1 Características de leche de burra	4
2.1.1 Composición, calidad y estabilidad de la leche.....	4
2.1.2 Bacterias presentes en leche como contaminantes y ETA's	6
2.1.3 Staphylococcus en la salud pública	7
2.1.3.1 <i>Staphylococcus</i>	8
2.1.3.2 <i>Staphylococcus chromogenes</i>	8
2.1.3.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	8
2.1.3.4 <i>Staphylococcus lentus</i>	9
2.1.3.5 <i>Staphylococcus intermedius</i>	9
2.1.3.6 <i>Staphylococcus simulans</i>	9
2.2 Prueba TriSensor® para detección de antibióticos en leche cruda	10
2.3 Pruebas de identificación bacteriana en leche cruda	10
2.4 Genes de resistencia a antibióticos.....	11

2.5 Enfermedades relacionadas a ETA's.....	11
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1 Ubicación geográfica de investigación.....	13
3.2 Población y muestra.....	14
3.2.1 Variables del estudio.....	15
3.3 Materiales y métodos.....	16
3.3.1 Materiales.....	16
3.3.2 Métodos.....	18
3.3.2.1 Toma de muestras.....	19
3.3.2.2 Método analítico TriSensor® para detección de antibióticos en leche cruda (tiras reactivas).....	20
3.3.2.3 Método analítico para recuento de <i>Staphylococcus</i> mediante PetriFilm en leche cruda.....	21
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
4.1 Resultados.....	22
4.2 Frecuencia.....	22
4.2.1 Resultados en tiras reactivas.....	22
4.2.2 Resultados en placas 3M™ Petrifilm™.....	22
4.2.3 Resultados del antibiograma.....	23
4.3 Análisis de muestra por antibiótico.....	26
4.4 Análisis comparativos.....	32
4.5 Discusión.....	34
4.6 Limitantes del estudio.....	37
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
5.1. Conclusiones.....	38

5.2. Recomendaciones.....	39
REFERENCIAS	40
ANEXOS	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Estimación de los componentes de leche de burra.	5
Tabla 2 Comparación de la composición nutricional de leche de burra contra yegua, vaca, cabra y humana.	6
Tabla 3 Asignación de códigos en base a localización y animal muestreado. .	14
Tabla 4 Variables del estudio	15
Tabla 5 Porcentaje identificado de bacterias pertenecientes al género <i>Staphylococcus</i>	23
Tabla 6 Susceptibilidad del <i>Staphylococcus</i> hacia antibióticos	23
Tabla 7 Valoración de UFC/ml en relación a la frecuencia por cada muestreo.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.Localización de sectores para recolección de muestras de leche cruda en el sur de Quito marcado con puntos de colores numerados.	13
Figura 2.Diagrama de recolección de muestras de LB.....	18
Figura 3.Diagrama de metodología de tiras reactivas TriSensor® para la detección de antibióticos en leche cruda.....	20
Figura 4. Diagrama de análisis de placas 3M™ Petrifilm™ para análisis de leche cruda en laboratorio.....	21
Figura 5.Comparación de resistencia y sensibilidad ante distintos antibióticos (n=165).....	25
Figura 6.Resultado del antibiograma para ampicilina.....	26
Figura 7.Resultado del antibiograma para amoxicilina + ácido clavulánico.....	27
Figura 8.Resultado del antibiograma para ceftriaxona.	27
Figura 9.Resultado del antibiograma para cefalexina.	28
Figura 10.Resultado del antibiograma para ciprofloxacina.....	28
Figura 11.Resultado del antibiograma para cloranfenicol.	29
Figura 12.Resultado del antibiograma para enrofloxacin.	29
Figura 13.Resultado del antibiograma para gentamicina.	30
Figura 14.Resultado del antibiograma para oxacilina.....	30
Figura 15.Resultado del antibiograma para sulfatrimetropin.	31
Figura 16.Resultado del antibiograma para tetraciclina.	31
Figura 17.Comparación de casos positivos entre cada muestreo.	32
Figura 18.Comparación de especies bacterianas en primer muestreo.	33
Figura 19.Comparación de especies bacterianas en segundo muestreo.....	33

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

En la antigüedad el consumo de leche de burra (LB), estaba presente en las culturas griega y romana, quienes la utilizaban como remedio para resolver distintos problemas de salud como lo menciona Pierre-Olivier Fanical, en su libro *“La leche, la vaca y el habitante de la ciudad”* (Quagliariello, 2017). En la actualidad, se estima que la población mundial de burros abarca un total de 40 millones de animales (96.4%), en África representa el 73% de la población total de equinos, mientras que en otras regiones tales como: Asia (49.0%), América (15.2%), Europa (8.2%) y Oceanía (2.2%) proporcionalmente (Colavita, Amadoro, Rossi, Fantuz, & Salimei, 2016).

En Ecuador el consumo se replica en las calles del sur de Quito, donde se encuentran puntos de comercialización de leche de burras y cabras, ordeñadas de manera manual y directa para la obtención de leche cruda, que es ingerida sin ningún proceso de pasteurización. Este consumo está vinculado a las creencias sobre las propiedades curativas que se le atribuye (Malaver, 2016). Sin embargo, los principales problemas que se podrían ver asociados a su consumo serían la contaminación bacteriana, además de la utilización de antibióticos profilácticos o terapéuticos en leche sin supervisión veterinaria; lo que genera una problemática hacia el ser humano y la actual resistencia inducida a través de alimentos.

Finalmente, en años recientes se ha dado un creciente interés hacia nuevas alternativas nutricionales que sustituyan a la leche de origen bovino en casos de alergias y en la prevención de patologías metabólicas, entre otras (Trinchese *et al.*, 2015). La revalorización de leche de burra genera varios puntos que deben ser valorados por entidades de control e investigadores, puesto que distintos componentes de la leche, así como los métodos de producción, pueden llegar a tener un efecto contraproducente que represente un potencial riesgo hacia la salud.

1.2 Problema

El consumo de leche cruda de burra está estrechamente vinculado con la idiosincrasia de la ingesta propio de cierto grupo demográfico de la ciudad de Quito. Por lo tanto, la inherente probabilidad de presencia de especies bacterianas no se encuentra definida actualmente dada falta de estudios que demuestren la existencia de bacterias y residualidad de antibióticos presentes. Al no existir pruebas de laboratorio que validen la calidad de este tipo de leche, este producto debe considerarse como un factor de inseguridad hacia su consumo (ETA's), ya que al no estar regularizado bajo ningún parámetro de calidad o higiene por parte de los vendedores ambulantes se considera un peligro potencial para los consumidores. Esto se ve reflejado gracias al nulo control y monitorización por parte de entidades de salud pública que remarcan el desconocimiento del verdadero riesgo que conlleva consumir este tipo de leche y lo que puede desencadenar tanto en actuales consumidores como futuros consumidores.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Determinar la presentación de *Staphylococcus* y tres tipos de antibióticos en la leche cruda de burra expendida en el sector sur de Quito por vendedores ambulantes para asociarlo a riesgos de ETA's para los consumidores.

1.3.2 Objetivos específicos

- Realizar cultivos bacterianos mediante 3M™ Petrifilm™ para determinar la presencia de *Staphylococcus spp.* en leche cruda de burra comercializada en el sur de Quito, y así valorar la carga de UFC y si es un riesgo para el consumo de leche.
- Identificar la presencia de tetraciclina, sulfonamidas y betalactámicos mediante tiras reactivas y multiresistencia del *Staphylococcus spp.* presente en la leche mediante antibiogramas, para relacionarlo al uso inapropiado de estos fármacos y los LMR del CODEX alimentario.

1.4 Hipótesis

La leche cruda de burra que se comercializa en el sur de Quito, presentan trazas de antibióticos (Betalactámicos, Sulfonamidas y Tetraciclinas) y contaminación de *Staphylococcus*.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Características de leche de burra

La variabilidad de características que se pueden llegar a describir en la LB están ligadas por ser un alimento con alto valor proteico, sin embargo, como Varga (2007) lo describe al ser un alimento altamente nutritivo, presenta un ambiente ideal para el crecimiento de muchos microorganismos. Por otra parte, también existen componentes antibacterianos asociados a las proteínas que generan protección y estabilidad propia hacia la LB, debido al factor de defensa lisosomal y la asociación de lactoferrina e inmunoglobulinas que inhiben el crecimiento bacteriano, contribuyendo a la disminución de infecciones entre otras sustancias inhibitorias (Vincenzetti *et al.*, 2014).

Este tipo de leche es viable como sustituto para personas con problemas de alergia e intolerancias a la lactosa. La digestibilidad presente en LB con respecto al perfil proteico, lipídico, contenido mineral y vitamínico, manifiesta una gran tolerancia hacia el uso pediátrico en niños que no asimilen sustratos de origen bovino (Šarić *et al.*, 2012).

En modelos experimentales se han dado acciones antiinflamatorias, antitumorales, hipolipidémicas lo cual da una posible utilización para el consumo en ancianos y en terapia de obesidad. Por su alto perfilamiento de ser un alimento alternativo, enfocado a necesidades de grupos específicos de consumidores con el menor impacto posibles en la salud, se vuelve necesario verificar con mayor alcance varios grupos de consumidores sensibles para llegar a ser válido como un impacto positivo (Martini, Salari, *et al.*, 2018).

2.1.1 Composición, calidad y estabilidad de la leche

En lo que respecta a la composición de la LB, presenta ciertas discrepancias en sus componentes con relación a otros tipos de especies tales como: vaca, yegua, cabras y humana. A continuación, se puede apreciar un cuadro con la estimación de componentes de LB (Ver tabla 1) y características nutricionales entre la LB

versus cuatro especies mencionadas previamente (Ver tabla 2).

Tabla 1

Estimación de los componentes de leche de burra.

	n	Media	SD	Min	Max
Proteína (g/100 g)	43	1.5	0.3	1.1	2.4
Grasa (g/100 g)	43	0.7	0.8	0,1	3.8
Lactosa (g/100 g)	43	6.5	0.4	4.7	7.3
SCC ^a (10 ³ /mL)	43	12.4	9.4	1	42
Conteo bacteriano (10 ³ UFC/mL)	43	2.6	2.1	0	11
Actividad lisosomal (U/mL)	37	9500	4200	3900	23000

^a Conteo de células somáticas.

Nota. n= Tamaño de muestra; SD=Desviación estándar; Min=Mínimo; Max=Máximo. Adaptada de Murgia *et al.*, 2016 Fuente:(Murgia *et al.*, 2016).

El perfil de proteínas y porcentaje de lactosa de LB es muy similar con respecto a la leche humana (7% lactosa), lo que estimula la absorción de calcio a nivel intestinal (0.36%). Los rangos de proteínas totales contenidos en leche humana es 1.42 g/100 mL y la LB 1.5-1.63 g/mL. Además los rangos de UFC en especies ovinas presentan rango normales que van de 300.000 a 500.000 UFC/ml, que dan una referencia aproximada a los valores presentados en la Tabla 1. El bajo nivel de proteínas totales ayuda a que no se genere una excesiva carga renal en niños. Las caseínas en leche presentan fracciones diferentes en base a la especie animal de la que provengan, como las más representativas caseínas existentes en leche de vaca son alpha-s1 y beta-caseína; mientras la LB posee una pequeña fracción de 0.37g/100 mL y se pueden encontrar bajos niveles de alpha-s1 y kappa-caseína (Cunsolo *et al.*, 2017; Martini, Altomonte, Licitra, & Salari, 2018).

A pesar de esto, investigadores como Luo manifiestan que la estabilidad térmica de LB se debe igualmente en gran medida a la relación del porcentaje de proteínas de caseína y suero, por lo tanto al evaluar su estabilidad debe considerarse deficiente si no se da un tratamiento y manejo adecuado, lo que puede generar problemas en la conservación y esto favorecer a la proliferación

de ciertas familias bacterianas (Luo, 2019).

Tabla 2

Comparación de la composición nutricional de leche de burra contra yegua, vaca, cabra y humana.

Leche	pH	Grasa (%)	Proteínas (%)	Lactosa (%)	Materia mineral (%)	Valor energético (KJ/kg)
Burra	7.0-7.2	1.21	1.74	6.23	0.43	1939
Cabra	6.3-6.8	4.62	3.41	4.47	0.73	3399
Humana	7.0-7.5	3.38	1.64	6.69	0.22	2856
Vaca	6.6-6.8	3.46	3.43	4.71	0.78	2983
Yegua	7.1-7.2	0.85	2.06	6.26	0.35	1878

Adaptada de Milonis y Polidori (2011, p. 282); como se lee en *Latte di Asina. Produzione, caratteristiche e gestione dell'azienda asinina*; (Cunsolo et al., 2009)

La estabilidad de la leche de vaca, cabra, yegua, burra y humana se debe a la actividad antioxidante de sus principales componentes como: caseína, suero y grasa. En condiciones alteradas de conservación, el proceso de oxidación se puede acelerar bajo exposición de altas temperaturas e incremento de aire. Sin embargo, la LB manifiesta mayor estabilidad oxidativa por su nivel graso y capacidad de eliminación de radicales, lo que promueve la estabilidad térmica en conjunto con su porcentaje total de proteínas de caseína y suero, por lo tanto al evaluar otros factores (Bučević-Popović, Delas, Međugorac, Pavela-Vrančić, & Kulišić-Bilušić, 2014; Li, Liu, & Guo, 2018).

2.1.2 Bacterias presentes en leche como contaminantes y ETA's

El riesgo de presencia de bacterias en leche cruda y sus derivados es una de las causas usuales de proliferación de microorganismos patógenos, los que representan un factor contaminante para cualquier individuo que la consuma.

Según datos de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), “desde 1993 hasta 2012, se registraron 127 brotes vinculados a la leche cruda o productos lácteos crudos, los mismo que generaron más de 1.909 enfermedades y 144 hospitalizaciones” (FDA, 2018).

La leche de cualquier origen animal sin un proceso de pasteurización puede presentar bacterias perjudiciales tales como: *Brucella*, *E.coli*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus* entre otros patógenos, que se derivan en enfermedades comúnmente denominadas "intoxicaciones alimentarias", las cuales de no ser atendidas llegan a derivarse en cuadros crónicos que pueden conseguir comprometer la vida del consumidor.

Los principales grupos demográficos en riesgo que se ven afectados por brotes de ETA's en la salud pública son: niños, adultos mayores y personas con problemas inmunitarios recurrentes. Anualmente se llegan a reportar un índice considerable de brotes asociados al consumo de leche cruda y sus derivados, lo que representa "Desde el 2007 a 2016, por lo menos que un niño menor de cinco años resultó afectado constituyendo un 46% en casos vinculados al consumo de leche según datos de la CDC". Así mismo, dentro de estos brotes un 19 % son generados por *Salmonella* y un 15 % por *E. coli*. Hoy por hoy se estima que alrededor de los 76 millones de enfermedades reportadas en los Estados Unidos, las 325.000 hospitalizaciones y 5.000 muertes son provocadas por ETA's (CDC, 2017; Kadariya, Smith, & Thapaliya, 2014).

Los síntomas usuales de las enfermedades transmitidas por los alimentos van desde artralgias, calambres abdominales, dolor de cabeza, diarrea, fiebre, mialgias, vómitos y deshidratación (CDC, 2017; Switaj, Winter, & Christensen, 2015).

2.1.3 Staphylococcus en la salud pública

Las enfermedades de origen estafilocócicas generalmente se transmiten mediante alimentos como resultado de la contaminación por enterotoxinas. Entre las especies con mayor manifestación a nivel mundial se encuentre el *S. aureus*, esta bacteria ha sido analizada frecuentemente por investigadores de Estados Unidos que estiman que hay 241.000 enfermedades al año a causa de este agente patógeno. A pesar de esto, la incidencia real de *Staphylococcus* asociados a ETA's se ve afectada debido a malos diagnósticos, inadecuado proceso de recolección y manejo de muestras en el laboratorio.

Los reportes de brotes, sin embargo, sugieren que la mayoría de casos tendrían relación con un erróneo manejo de alimentos que va desde su procesamiento hasta la cocción. El principal factor involucrado sería la falta de desinfección de equipos, pérdidas en la cadena de frío y contaminación cruzada en el hogar; lo que indicaría que los consumidores poseen un riesgo potencial tanto hacia su salud, como en lo productivo y económico (Kadariya *et al.*, 2014).

2.1.3.1 *Staphylococcus*

El *Staphylococcus* está dentro del orden *Bacillales* e incluye 42 especies diferentes y algunas de ellas forman parte de la flora de varios mamíferos. Por lo general esta bacteria tiende a colonizar zonas específicas del huésped. Dentro de las especies mayormente patógenas se encuentra el *S. aureus* por su nivel de patogenicidad al ser una especie Gram positiva la cual es difícil de identificar, siendo las muestras clínicas la manera más directa y efectiva. La principal característica que diferencia al *Staphylococcus* de otras especies es la producción de la enzima coagulasa, lo cual deriva en la coagulación del plasma (Pahissa, 2009).

2.1.3.2 *Staphylococcus chromogenes*

El *S. chromogenes* es uno de los principales *Staphylococcus* coagulasa negativos, muy frecuente en casos de mastitis en bovinos y caprinos. Este patógeno tiene la capacidad de coagular plasma y actividad citotóxica que redondea las células infectadas (Vanderhaeghen *et al.*, 2014).

2.1.3.3 *Staphylococcus epidermidis*

El *S. epidermidis* es una bacteria Gram positiva formada por una estructura de cocos ya que manifiesta la tendencia de concentrarse en racimos. Además, se constituyen de un tamaño inferior a la micra y generando colonias que no manifiestan pigmentación, al mismo tiempo que son uno de los miembros más frecuentes en superficies epiteliales humanas.

Son patógenos nosocomiales debido a sus mecanismos de infección pasiva en

los que generan biopelículas y aglomeración de adhesinas que impiden la acción de mecanismo de defensa del huésped. Igualmente el *S. epidermidis* genera exoenzimas y polímeros de superficie protectora que juegan un rol importante en el equilibrio de la microflora epitelial (Otto, 2014).

2.1.3.4 *Staphylococcus lentus*

Esta especie bacteriana pertenecen al grupo *Staphylococcus sciuri*, subespecie *lentus*. Consiste en formas de cocos agrupados, miembros Gram-positivos de oxidasa-positivos y coagulasa-negativos. El grupo *S. lentus* es parte de la flora normal de la piel de los animales y las superficies mucosas, a menudo se aíslan de varios productos fermentados de origen animal, y la cantidad de cepas aisladas de la bacteria presenta potencial para la fabricación de enterotoxinas en el organismo de varios seres vivos (Nam, Chung, Seo, Lim, & Yi, 2012).

2.1.3.5 *Staphylococcus intermedius*

La especie de *Staphylococcus intermedius* fue definida en 1976, cuando se le denominó de esta manera debido a manifestar propiedades similares a *S. aureus* y en menor proporción a *S. epidermidis* (Bes *et al.*, 2002). Es un *Staphylococcus* coagulasa positivo y un organismo zoonótico que puede aislarse de distintos animales domésticos hasta aves silvestres, que incluyen muestra recuperadas de piel, nariz, orejas y con manifestaciones en infecciones invasivas y no invasivas.

Entre las especies con mayor prevalencia se encuentran palomas, perros y ocasionalmente se dan infecciones reportadas en humanos. Los escasos reportes a causa de *S. intermedius* son vinculados a intoxicaciones alimentaria o mordeduras de perros (Futagawa-Saito, Ba-Thein, & Fukuyasu, 2007).

2.1.3.6 *Staphylococcus simulans*

La cepa de *Staphylococcus simulans* secreta una lipasa no inducida en el medio de cultivo. La lipasa de *Staphylococcus simulans* (SSL), purificada hasta la

homogeneidad, es una proteína tetramérica (Sayari, Agrebi, Jaoua, & Gargouri, 2001).

2.2 Prueba TriSensor® para detección de antibióticos en leche cruda

La prueba rápida que se emplea para la detección simultánea de distintos antibióticos en muestras es el Kit TriSensor®, que detecta betalactámicos y sulfamidas como de tetraciclinas en muestras de leche. El proceso de detección involucra un micro pocillo de receptores y anticuerpos enlazados con partículas de oro. El segundo componente son tiras indicadores que poseen membranas lineales de captura específicas (Ver Figura 3).

Para generarse un resultado válido, la línea roja de control tiene que ser visible al cabo de la segunda incubación. (Anexo 4) y las otras líneas de pruebas específicas se encuentran debajo de la línea control. Una vez el reactivo del micro pocillo se vuelve a poner en suspensión con una prueba de leche positiva, los receptores se unen a los analitos durante los tres primeros minutos de incubación a 40°C. La aplicación de tiras reactivas en la validación de multiresistencia en leche es una de prueba de referencia que especifica las concentraciones de los análogos estructurales de varios antibióticos en múltiples reacciones cruzadas (Unisensor, 2016).

2.3 Pruebas de identificación bacteriana en leche cruda

El análisis con placas 3M™ Petrifilm™ se empleó para la valoración de UFC de *Staphylococcus* (Ver Figura 4) debido a que son un medio de cultivo listo para manejar, modificado cromogénico Baird-Parker, selectivo y diferencial para *S. aureus*.

Puede presentar colonias de coloración rojo-violetas en presencia de *S. aureus*, además también pueden presentar coloraciones rojo-violeta (negra o azul-verdosas) que serán diferenciadas mediante pruebas adicionales (manitol, maltosa, ONPG, DNAsa) para identificar la especie de *Staphylococcus* (AOAC,

2006).

Analizando varios estudios sobre el aislamiento del género *Staphylococcus* en leche de cabra, se determinó que existe un potencial riesgo a procesos infecciosos como la mastitis, los cuales en sus fenotipos de resistencia antimicrobiana que parecen estar asociados con elementos genéticos móviles transferidos entre diferentes especies de *Staphylococcus* (Coimbra *et al.*, 2019).

2.4 Genes de resistencia a antibióticos

El potencial genético por parte de las cepas bacterias recae en la capacidad de generar mutación o transferencia frente a la exposición de antibióticos. Los genes se pueden codificar mediante los plásmidos que replicaran a partir de su separación del cromosoma bacteriano, lo cual se asocia a la resistencia y derivan en tratamientos ineficaces (Stanchi, Martino, Gentilini, Reinosos, & Echeverría, 2007).

La resistencia múltiple bacteriana crea una alarmante preocupación hacia los patógenos nosocomiales y zoonóticos. Entre los patógenos nosocomiales con mayor manifestación se encuentran *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El resultado de la resistencia a los antibióticos se da por la inactivación del fármaco, modificación del objetivo del fármaco y disminución de acumulación intracelular asociada con una menor permeabilidad o un mayor flujo de salida del mismo fármaco.

2.5 Enfermedades relacionadas a ETA's

Los inconvenientes generados por ETA's a nivel mundial son uno de los problemas con mayor recurrencia y costos en la salud pública, debido a una alta prevalencia de casos diagnosticados incorrectamente.

La manifestación clínica se produce por ingestión de alimentos que poseen el agente etiológico que afecta al consumidor de manera crónica o aguda y al ser enfermedades alimentarias usualmente generan cuadros gastroentéricos y

síntomas inespecíficos como: diarreas, náuseas, fiebre, vómito, escalofríos, distensión y dolor abdominal.

En este sentido, la demanda de lácteos no pasteurizados (crudos) toma gran relevancia en políticas de seguridad alimentaria, ya que como productos orgánicos son vía potenciales de enfermedades. Si bien existen estudios transversales en varios países que demuestran los efectos inmunológicos que ejercen en la salud, el número de brotes es de 152 (66% por lácteos) asociados a 1.735 enfermedades según datos de CDC. Sin embargo, estudios de la OMS revelan que 31 tipos de ETA's generan alrededor de 600 millones de enfermedades y 420.000 muertes como resultado de diversos factores y parámetros difícilmente determinados con exactitud (Dewey-Mattia, Manikonda, Hall, Wise, & Crowe, 2018; Whitehead & Lake, 2018).

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación geográfica de investigación

El plano geográfico dentro de la investigación y recolección de muestras se ejecutó al Sur del Distrito Metropolitano de Quito, en varios puntos de comercialización ambulante de leche cruda de burra (Ver Figura 1), dispuestos en la siguiente lista de sur a norte, en distintos sectores tales como:

1. Sector “La Santiago”: Av. Mariscal Sucre y Av. Alonso de Angulo.
2. Sector “El Pintado”: Av. Mariscal Sucre e Illescas.
3. Sector “Chilibulo”: Av. Mariscal Sucre y Chilibulo.
4. Sector “La Magdalena”: Av. Mariscal Sucre y Puruhá.
5. Sector “La Mascota”: Av. Mariscal Sucre y Av. Los Libertadores.

El Sur del Distrito Metropolitano de Quito, presenta una temperatura media que fluctúa entre 13.9° C a 22° C, además con una precipitación de 1272 milímetros por año (mm/año) y una altitud de 2200 a 3100 metro por encima del nivel del mal (Climate-Data.org, 2018).

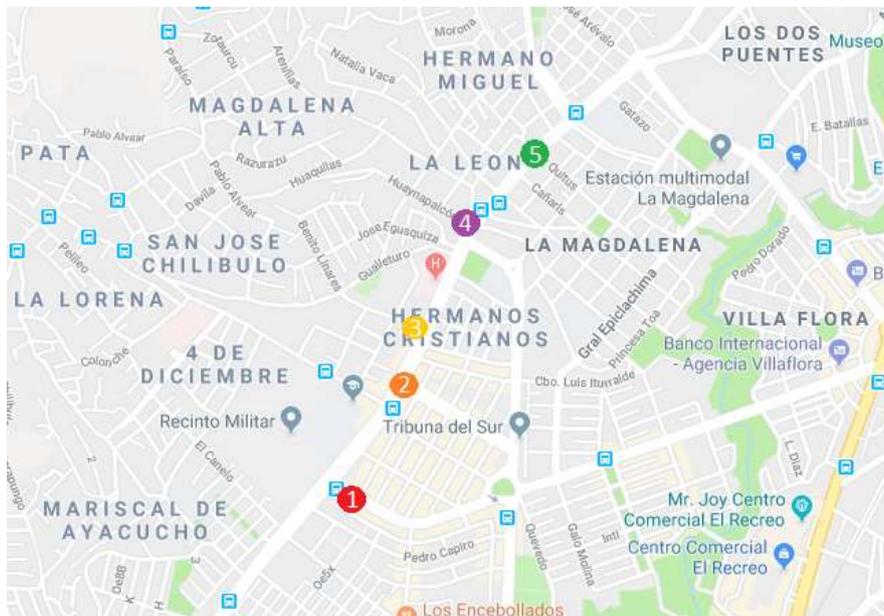


Figura 1. Localización de sectores para recolección de muestras de leche cruda en el sur de Quito marcado con puntos de colores numerados.

Las distintas muestras recolectadas fueron procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico LIVEXLAB®, el mismo en donde se obtuvieron resultados concluyentes para su valoración dentro de la investigación.

3.2 Población y muestra

El grupo de estudio fueron burras (*Equus asinus*), siendo exclusivamente valoradas las hembras que se encuentran en producción de leche (20 individuos) que son ordeñadas en los distintos sitios del sur de Quito, por parte de productores informales.

Se realizó la recolección en dos etapas de 20 muestras diarias, en un intervalo de tres días cada una, con el fin de obtener 40 muestras en total, mismas que fueron etiquetadas al cabo de su colecta para su posterior entrega al Laboratorio de Diagnóstico LIVEXLAB® de la ciudad de Quito.

Tabla 3

Asignación de códigos en base a localización y animal muestreado.

Código del sector	Sector	Color del sector	Número de animales	Código de muestra
1	“La Santiago”	Rojo	1,2,3,4,5	1.1 ; 1.2 ; 1.3 ; 1.4; 1.5
2	“El Pintado”	Anaranjado	1,2,3	2.1 ; 2.2 ; 2.3
3	“Chilibulo”	Amarillo	1,2,3,4	3.1 ; 3.2 ; 3.3 ; 3.4
4	“La Magdalena”	Morado	1,2,3	4.1 ; 4.2 ; 4.3
5	“La Mascota”	Verde	1,2,3,4,5	5.1 ; 5.2 ; 5.3 ; 5.4; 5.5

Nota. Número de animales=cada número corresponde a un animal; Código de muestra=corresponde a la unión del código del sector con el número de animal en orden ascendente.

3.2.1 Variables del estudio

Tabla 4.
Variables del estudio.

Variables	Tipo de variable	Definición	Indicador	Unidad de medida	Ítems	Instrumentos
Trazas	Cualitativa/ Dicotómico Independientes	Es el valor de residuos en relación al uso de antibióticos que se presentaran en leche.	Betalactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas.	SI/NO	SI/NO	Medición directa
Bacterias	Cuantitativa/ Continuas Dependiente	El porcentaje de bacterias en relación a formación de colonias.	Unidades Formadoras de Colonias.	UFC/ ml	# de UFC	Medición directa
Animales	Cuantitativa/ Discreta Dependientes	Es la cantidad de burras que producen leche	Burras	1-20	SI/NO	Medición directa

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Materiales

3.3.1.1 Materiales empleados en campo:

- Bolsas de hielo en gel.
- Caja de guantes de látex talla número 7.
- Cámara fotográfica.
- Cooler portátil.
- Cuaderno de anotaciones.
- Envases plásticos estériles de 125ml
- Esferográfico Bic®.
- Marcador permanente.

3.3.1.2 Materiales empleados en laboratorio:

- Heatsenser (incubadora a 40°C)
- Agar DNAsa
- Agar maltosa
- Agar manitol salado.
- Agua destilada.
- Agua.
- Alcohol.
- Bolsas de gel
- Cabina de bioseguridad
- Cajas Petri.
- Cámara fotográfica.
- Cinta adhesiva.
- Cuaderno de registro.
- Cofia.
- Discos ONPG (Betagalactosidasa)
- Dispensor
- Gel antibacterial.

- Guantes de vinilo.
- Incubadora.
- Jabón antibacterial.
- Kit Trisensor® (tiras reactivas)
- Mandil.
- Mascarilla.
- Marcador permanente.
- Mesa de trabajo.
- Micro pipeta.
- Microscopio.
- Muestras de leche.
- Pinza anatómica de metal.
- Pipeta automática.
- Placas 3M™ Petrifilm™ para recuento de *Staphylococcus*.
- Puntas autoclavables 0.2 ml.
- Puntas autoclavables 1ml.
- Refrigerador para muestra.

3.3.2 Métodos

En la figura 2 se exhibe la metodología empleada a nivel de campo para la ejecución de la investigación, con el fin de obtener muestras de leche cruda de burra. A continuación, en el anexo 1 se aprecia la población de animales que abarca el estudio a lo largo de sus puntos de distribución.

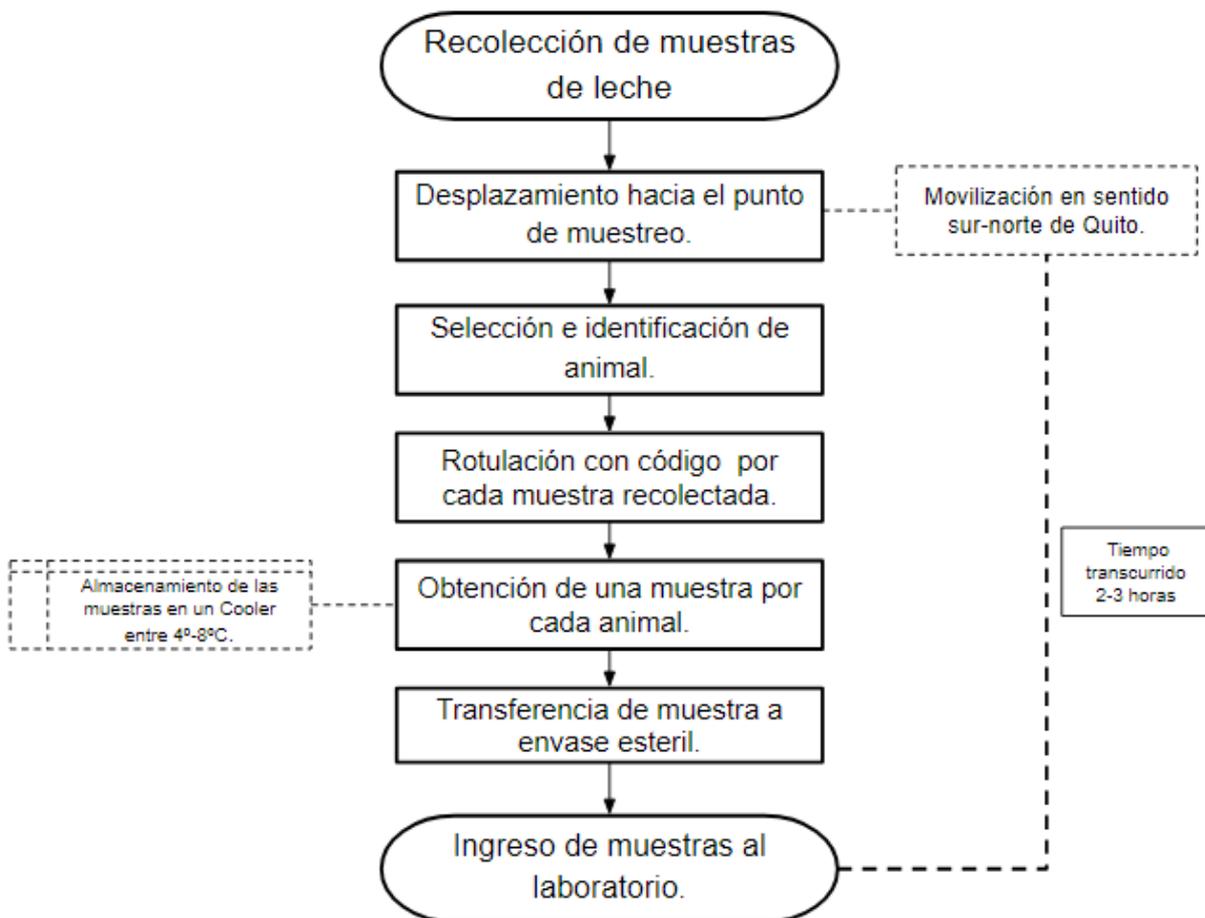


Figura 2. Diagrama de recolección de muestras de LB.

3.3.2.1 Toma de muestras

El procedimiento de muestreo fue realizado mediante el “Manual de Procedimiento para la Toma y Envío de muestras al laboratorio” descrito por parte del Laboratorio LIVEXLAB®. Un punto en particular que fue modificado del manual de muestra que menciona LIVEXLAB® es el lavado y desinfección previo de pezones, debido a que este proceso es un paso no realizado por los productores y el cual llega a ser un factor clave en la investigación.

La etapa de recolección se desarrolló el 30 de Julio y 01 de Agosto del 2019, a primeras horas de la mañana, que fueron desde las 6:30 hasta 7:30 am.

En las primeras instancias se definieron los puntos de recolección que van del Sector 1, Sector 2, Sector 3, Sector 4, Sector 5 los mismos que se observan en la Tabla 3, además se asignó un color por cada número como se aprecia en la Fig 1, este orden en particular se estableció con el objetivo de avanzar en sentido sur-norte en el menor tiempo posible (40–60 min aproximadamente) para que las muestras sean procesadas en el laboratorio en un estado fiable y se mantengan la cadena de frío.

Uno de los factores que se tuvo en consideración al momento de efectuar la compra y recolección de LB, fue obtener muestras directas tanto de bolsas o vasos plásticos (30ml), dependiendo la manera de comercialización de cada productor. Ya adquirida la LB se depositó un volumen cercano 20-40 ml en cada envase estéril de 125ml, siendo situada la tapa hacia arriba para impedir contaminación cruzada, evitando tocar los bordes cuando se vertía el contenido en su interior y para su cerrado final. Todo el proceso debe ser mediante la utilización de guantes para evitar contaminación cruzada.

Culminado este punto cada envase estéril de LB fue colocado en un cooler con bolsas de hielo en gel, que se mantuvo a una temperatura aproximadamente de 2-8°C. Finalmente fue rotulado cada frasco en base a los códigos previamente asignados como se expone en la Tabla 3.

3.3.2.2 Método analítico TriSensor® para detección de antibióticos en leche cruda (tiras reactivas).

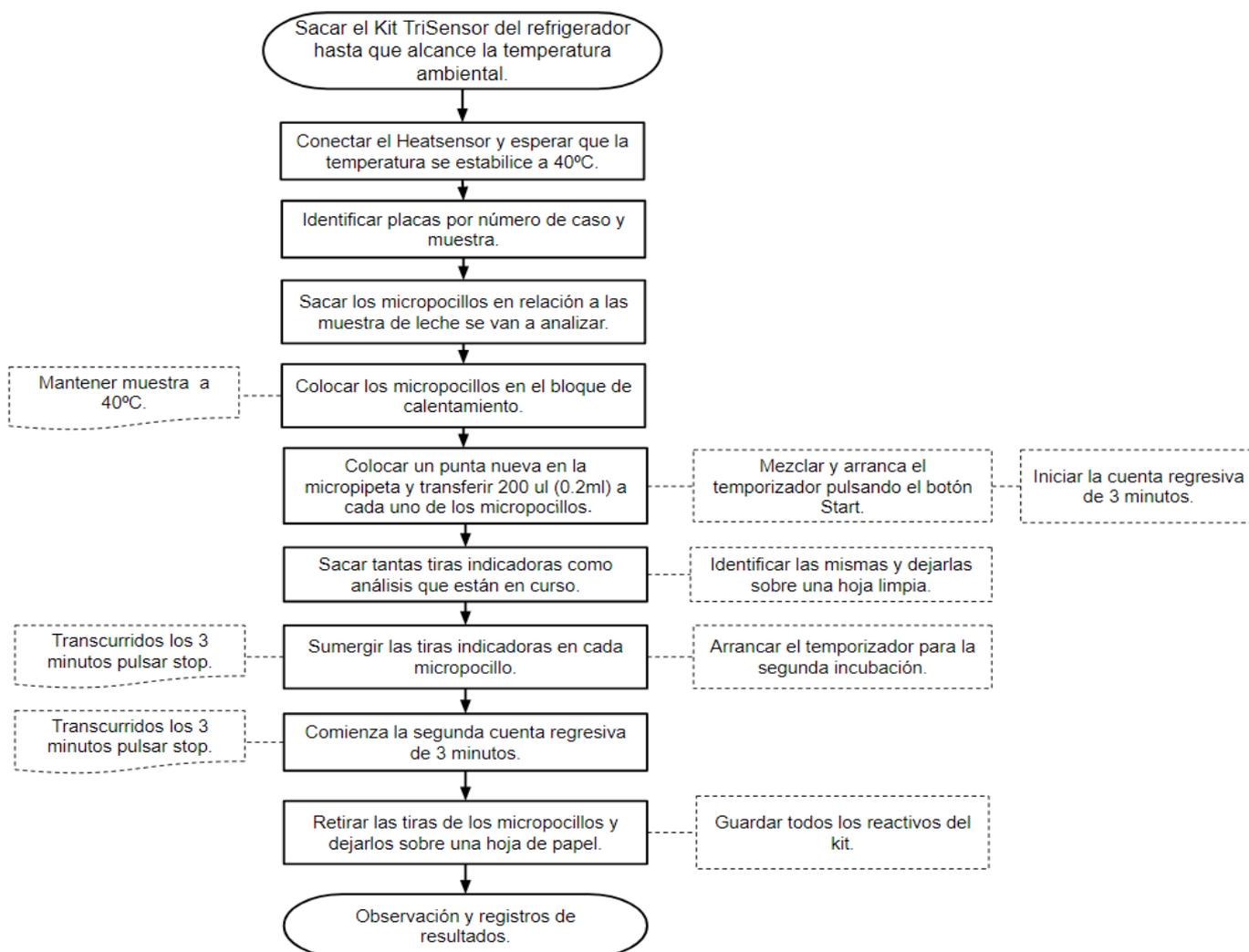


Figura 3. Diagrama de metodología de tiras reactivas TriSensor® para la detección de antibióticos en leche cruda.

3.3.2.3 Método analítico para recuento de *Staphylococcus* mediante Petrifilm en leche cruda.

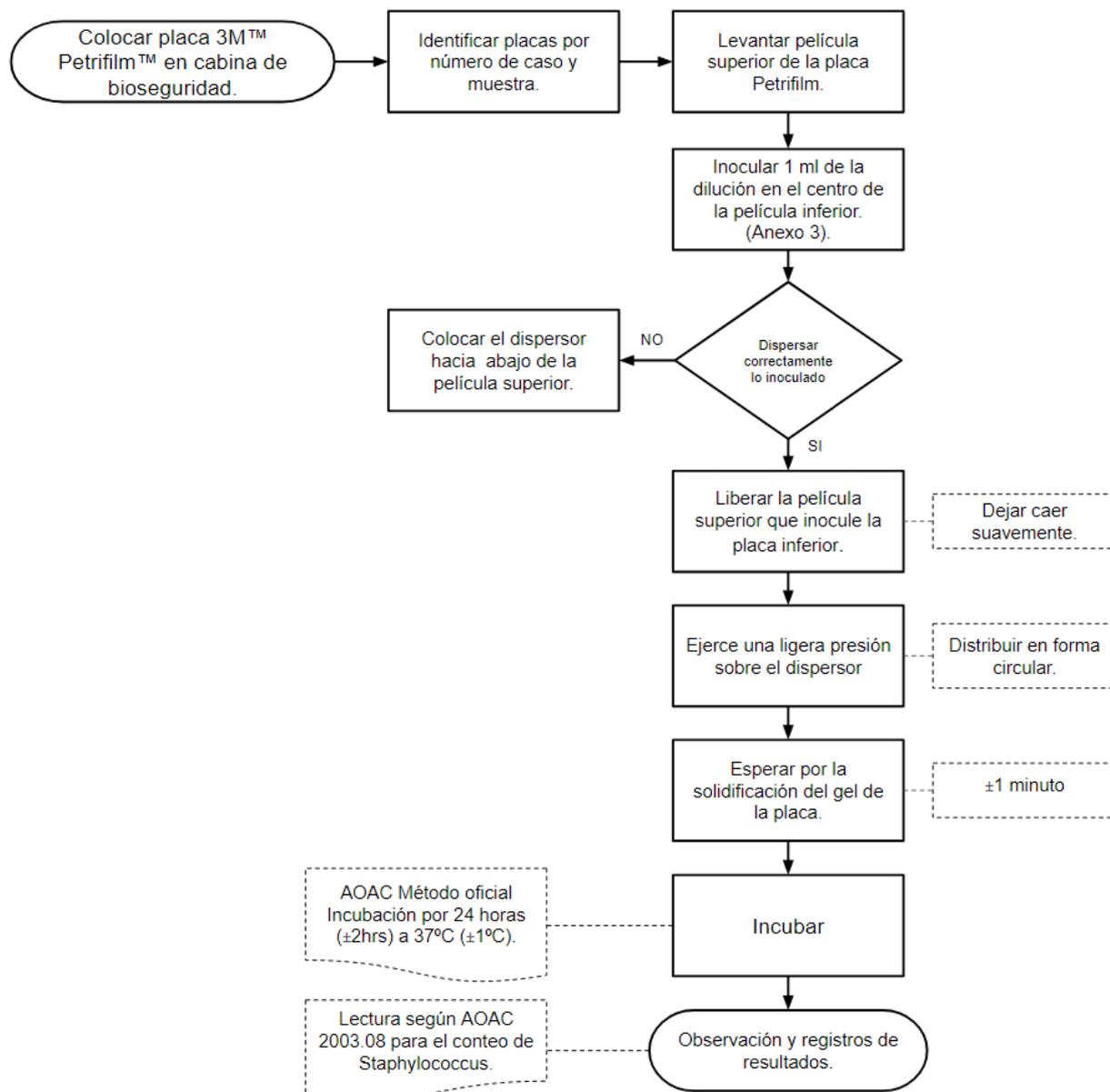


Figura 4. Diagrama de análisis de placas 3M™ Petrifilm™ para análisis de leche cruda en laboratorio.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

Los resultados obtenidos en la investigación de un total de 40 muestras recolectadas de leche cruda de burra procedentes de animales en los distintos sectores del sur de Quito que fueron analizadas en el laboratorio Livexlab, usando tiras reactivas (TriSensor®) con resultado negativo para la totalidad de las muestras y en cultivos 3M™ Petrifilm™ con 15 muestras positivas a 6 géneros distintos de *Staphylococcus*.

El estudio en cuestión consideró la realización de un antibiograma que demuestra la resistencia y sensibilidad de 11 antibióticos frente a las 6 especies bacterianas que no se pudieron identificar con las tiras reactivas (TriSensor®) para disminuir el índice de falsos negativos.

4.2 Frecuencia

4.2.1 Resultados en tiras reactivas

Los resultados obtenidos en las tiras reactivas (TriSensor®) correspondiente al análisis de las 40 muestras de leche cruda de burra, concluyeron que el 100% de las muestras no presentaron residuos de antibióticos frente a cada uno de los fármacos: Betalactámicos, Tetraciclinas y Sulfonamidas (Ver Anexo 5).

4.2.2 Resultados en placas 3M™ Petrifilm™

De las muestras analizadas mediante 3M™ Petrifilm™ se logró aislar 6 especies diferentes de bacterias, que son compatibles al género *Staphylococcus* y manifiestan crecimiento de UFC/ml, así como las frecuencias de muestras positivas en la investigación que se observa en la Tabla 5. El test 3M™ Petrifilm™ al arrojar una baja presencia de UFC en relación a la frecuencia de muestras positivas a *Staphylococcus* hace invalido la ejecución de pruebas estadísticas que manifiesten un valor real.

Tabla 5

Porcentaje identificado de bacterias pertenecientes al género Staphylococcus en el 100% de muestras recolectadas (n=15).

Especie bacteriana	Frecuencia	Porcentaje
<i>S.aureus</i>	4	26.7
<i>S.epidermidis</i>	5	33.3
<i>S.chromogenes</i>	1	6.7
<i>S.lentus</i>	1	6.7
<i>S.simulans</i>	1	6.7
<i>S.intermedius</i>	3	20
Total	15	100

4.2.3 Resultados del antibiograma

En las muestras sometidas al antibiograma se obtuvo 15 muestras positivas que manifestaron sensibilidad y resistencia a 11 antibióticos de distintas familias y con mayor predominancia en los fármacos betalactámicos y tetraciclinas (Ver Tabla 6).

Tabla 6

Susceptibilidad del Staphylococcus hacia antibióticos.

Código de muestra	Antibióticos										
	AMP	AMC	CEF	CET	CIP	CLO	ENR	GEN	OXA	SUL	TET
3.1	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3.2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3.3	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5.1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1.2	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1.5	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4.1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4.2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
4.3	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
5.2	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
2.1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3.4	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2.2	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
*2.1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
5.4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Nota. *=muestra reincidente en segundo muestreo; S=Sensibilidad; R=Resistencia; AMP=ampicilina; AMC=amoxicilina + ácido clavulánico; CEF=cefalexina; CET=ceftriaxona; CIP= ciprofloxacina; CLO= cloranfenicol; ENR: enrofloxacina.; GEN=gentamicina; OXA=oxacilina SUL=sulfatrimetropin; TET=tetraciclina.

Como se aprecia en la Tabla 5 y 6 las distintas especies de *Staphylococcus* obtenidas manifiestan una resistencia parcial del 10.3% hacia cierto grupos de antibióticos como: ampicilina, amoxicilina+ácido clavulánico y tetraciclina. Mientras que la sensibilidad exhibe un 89.7% con una dominante manifestación hacia antibióticos tales como: cefalexina, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol, enrofloxacin, gentamicina, sulfatrimetropin y oxacilina.

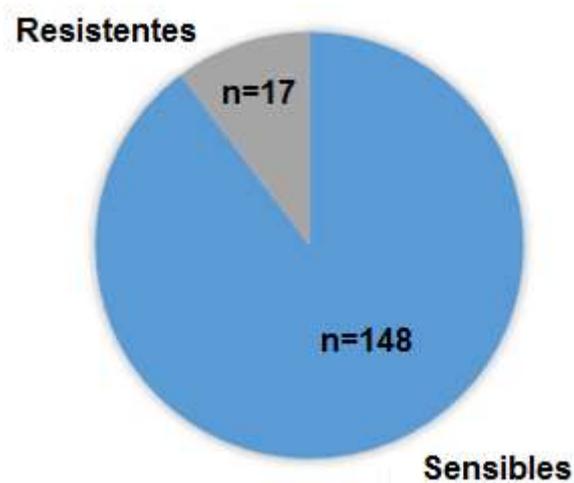


Figura 5. Comparación de resistencia y sensibilidad ante distintos antibióticos (n=165).

4.3 Análisis de muestra por antibiótico

4.3.1 Ampicilina

Se aprecia en la figura 6 el que el 26.67% presenta sensibilidad al antibiótico y 73.33% de resistencia de las muestras evaluadas.

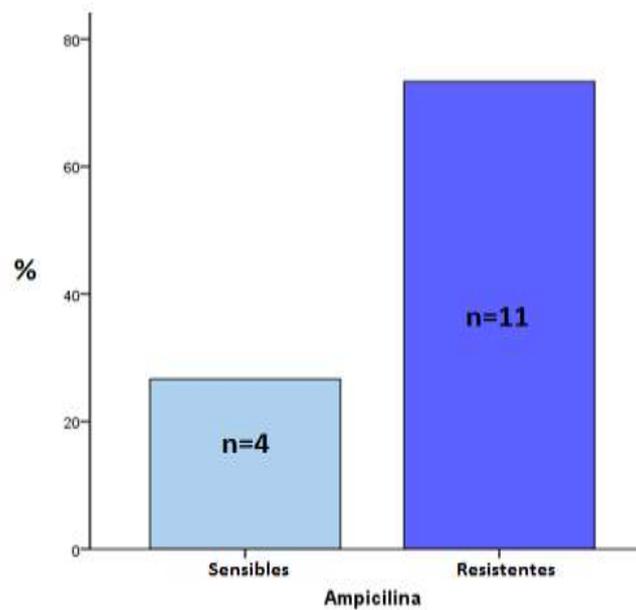


Figura 6. Resultado del antibiograma para ampicilina.

4.3.2 Amoxicilina + Ácido Clavulánico

Se aprecia en la figura 7 el que el 86.67% presenta sensibilidad al antibiótico y 13.33% de resistencia de las muestras evaluadas.

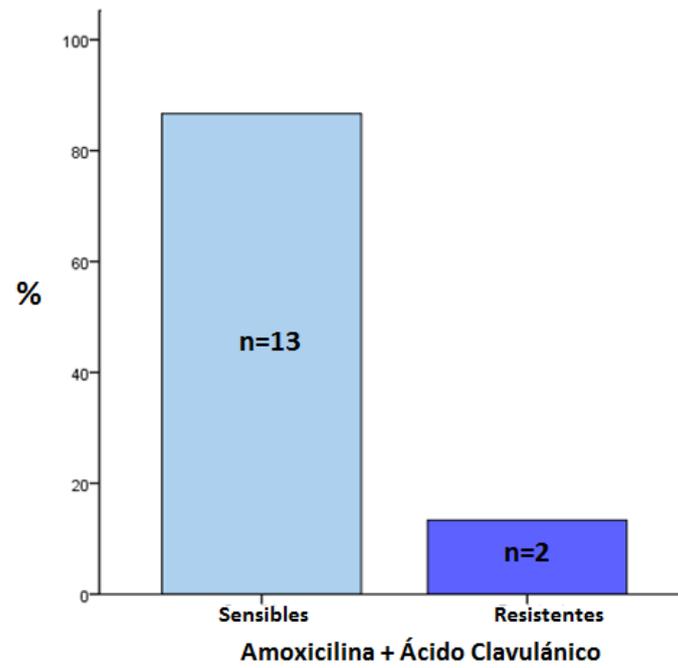


Figura 7. Resultado del antibiograma para amoxicilina + ácido clavulánico.

4.3.3 Ceftriaxona

Se aprecia en la figura 8 el 100% que presentan sensibilidad al antibiótico evaluado.

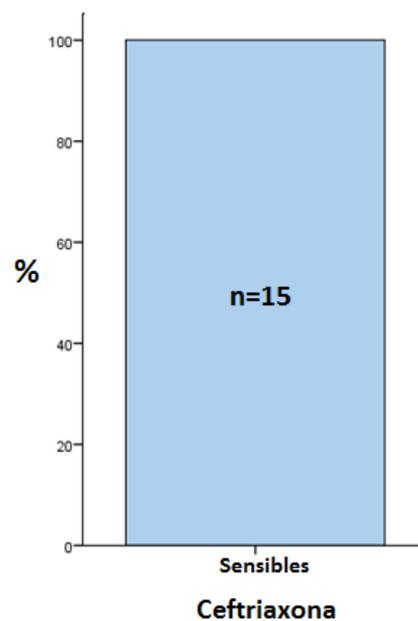


Figura 8. Resultado del antibiograma para ceftriaxona.

4.3.4 Cefalexina

Se aprecia en la figura 9 el 100% que presentan sensibilidad al antibiótico evaluado.

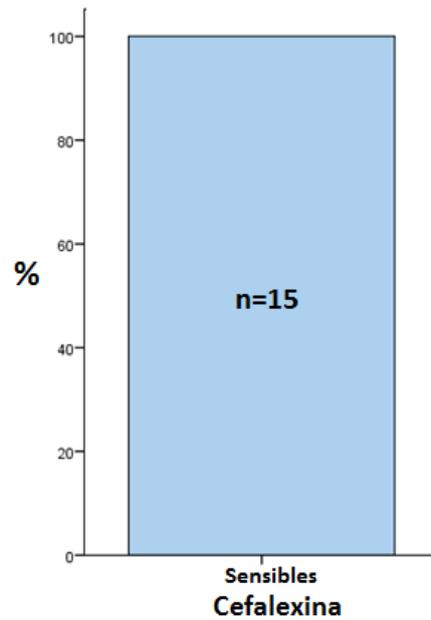


Figura 9. Resultado del antibiograma para cefalexina.

4.3.5 Ciprofloxacina

Se aprecia en la figura 10 el 100% que presentan sensibilidad al antibiótico evaluado.

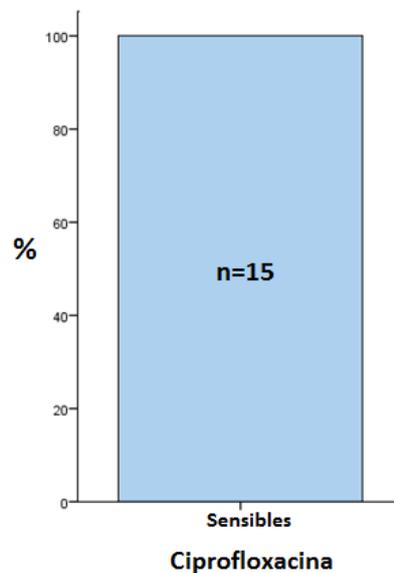


Figura 10. Resultado del antibiograma para ciprofloxacina.

4.3.6 Cloranfenicol

Se aprecia en la figura 11 el 100% que presentan sensibilidad al antibiótico evaluado.

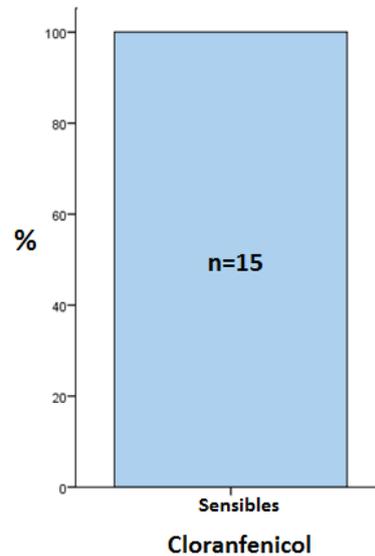


Figura 11. Resultado del antibiograma para cloranfenicol.

4.3.7 Enrofloxacin

Se aprecia en la figura 12 el 100% que presentan sensibilidad al antibiótico evaluado.

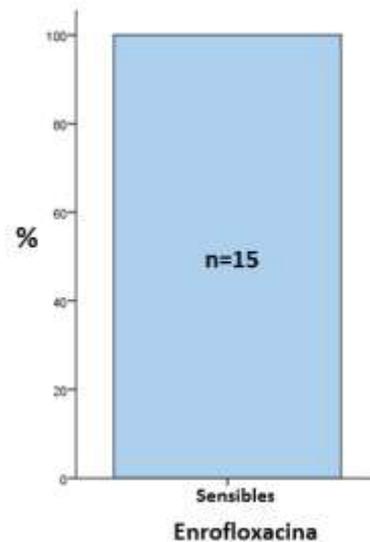


Figura 12. Resultado del antibiograma para enrofloxacin.

4.3.8 Gentamicina

Se aprecia en la figura 13 el 100% que presentan sensibilidad al antibiótico evaluado.

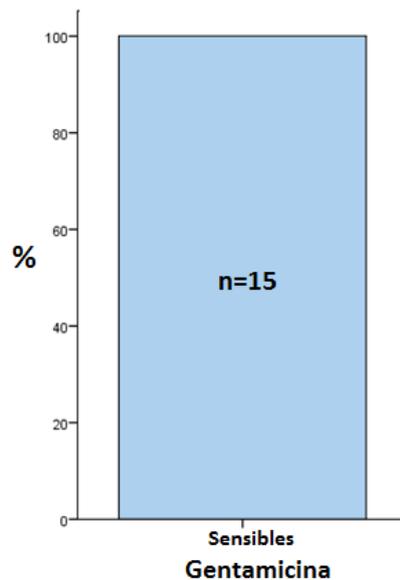


Figura 13. Resultado del antibiograma para gentamicina.

4.3.9 Oxacilina

Se aprecia en la figura 14 el 100% que presentan sensibilidad al antibiótico evaluado.

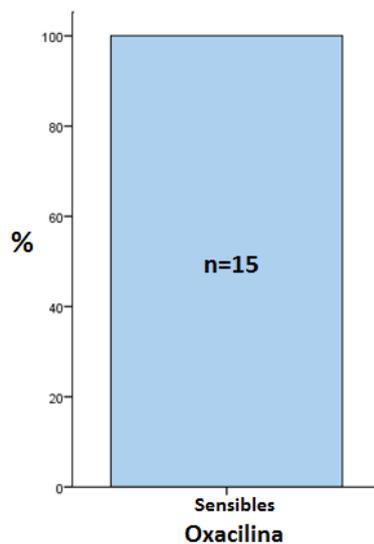


Figura 14. Resultado del antibiograma para oxacilina.

4.3.10 Sulfatrimetropin

Se aprecia en la figura 15 el 100% que presentan sensibilidad al antibiótico evaluado.

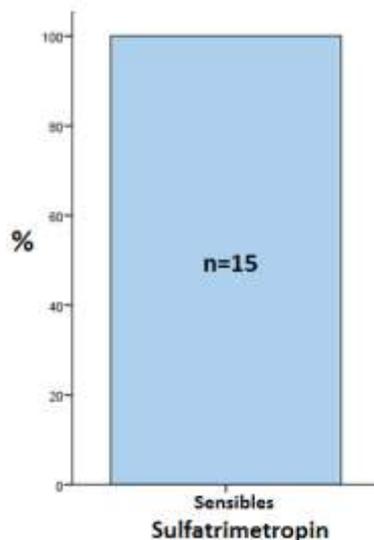


Figura 15. Resultado del antibiograma para sulfatrimetropin.

4.3.11 Tetraciclina

Se aprecia en la figura 16 el que el 73.33% presenta sensibilidad al antibiótico y 26.67% de resistencia de las muestras evaluadas.

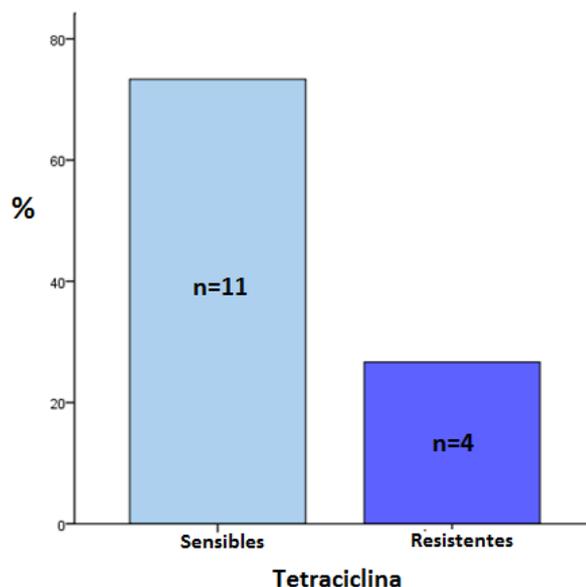


Figura 16. Resultado del antibiograma para tetraciclina.

Del presente estudio elaborado en leche cruda de burra, se determinó un grupo variado de especies bacterias propias de tejidos epiteliales, que al efectuar pruebas de sensibilidad arrojó 15 muestras positivas y de ellas 3 muestras que manifestaron resultados ambivalentes con resistencia y sensibilidad en diferentes grados como se observa en las figuras 6, 7, 16.

4.4 Análisis comparativos

En las 40 muestras evaluadas con 3M™ Petrifilm™ se generaron 15 muestras positivas. Los resultados conseguidos de los casos positivos en cada uno de los muestreos, un 20% de las muestras obtenidas corresponde al primer muestreo realizado el 30-07-2019 y 80% al segundo muestreo (Ver figura 17).

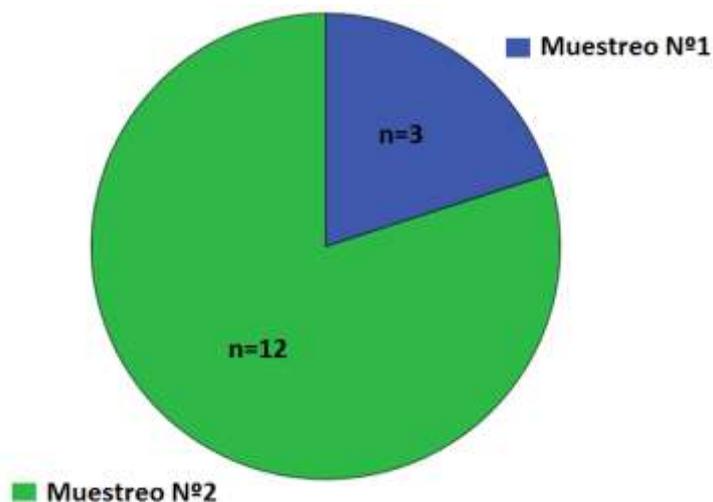


Figura 17. Comparación de casos positivos entre cada muestreo.

Tabla 7

Valoración de UFC/ml en relación a la frecuencia por cada muestreo.

UFC/ml	UFC						
	1	3	6	8	10	11	64
Conteo de muestras (n=15)							
Muestreo Nº1	2	0	0	0	0	0	1
Muestreo Nº2	5	2	1	1	2	1	0

Nota. Muestreo Nº1=corresponde a la fecha del 30-07-2019; Muestreo Nº2=corresponde a la fecha del 01-08-2019.

En las muestras evaluadas en el muestreo N°1 con 3M™ Petrifilm™ se obtuvo un 33% de casos positivos para *S.aureus* mientras que el 67% a *S.intermedius* presentes en la leche cruda de burra como se observa en la figura 18.

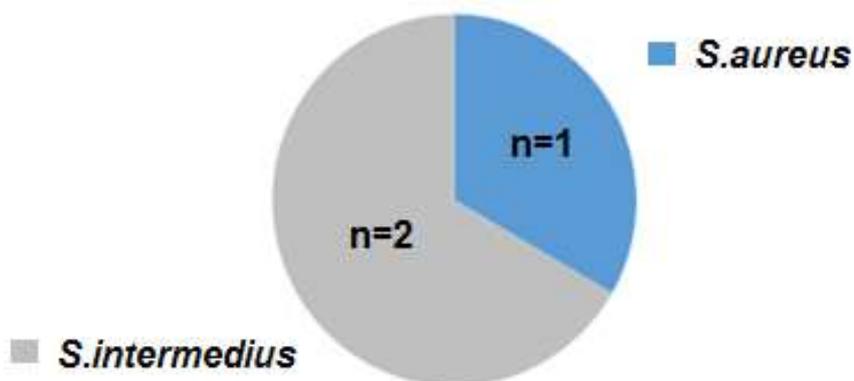


Figura 18. Comparación de especies bacterianas en primer muestreo.

Por otra lado en el muestreo N°2 realizado con 3M™ Petrifilm™ se encontró una mayor variedad de especies positivas a *Staphylococcus*, en este segundo muestreo se descubrió un 42% *S. epidermis*, 25% *S.aureus*, 8% *S.simulans*, 8% *S.lentus*, 8% *S.chromogenes* y 9% *S.intermedius* como se observa en la figura 19.

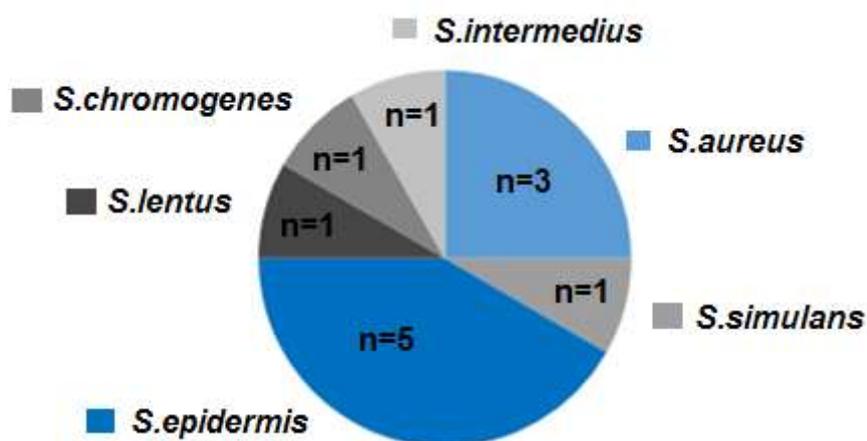


Figura 19. Comparación de especies bacterianas en segundo muestreo.

4.5 Discusión

En el estudio de López (2018) se detectó la aparición de trazas de antibióticos mediante la utilización de tiras reactivas TriSensor® en leche cruda de cabra en el Distrito Metropolitano de Quito, las mismas que comparten rutas similares de comercialización con respecto a la leche de burra y en ciertos casos las dos especies animales pertenecen a los mismos comerciantes (como se observa en el Anexo 1 y 4). En dicho análisis obtuvo quince muestras positivas a residuos de betalactámicos y una minoría a tetraciclinas, que en relación a la presente investigación no manifestaron resultados positivos y que por el contrario todas las muestras reflejaron datos negativos a la presencia de trazas de antibióticos. La diferencia entre los porcentajes podría tener relación directa con el tamaño de población de cabra (n=90) en comparación al de burras (n=20) que representa una muestra casi 4.5 veces más grande que la del presente estudio.

En el año 2003 Ingham, Becker, y Fanslau en USA, identificaron *S. aureus* en nueve de las doce muestras evaluadas en leche cruda de bovino con 3M™ Petrifilm™ en su investigación y determinaron que los niveles de organismos bacterianos se encontraban entre 1.0 y 3.0 log UFC/ml tanto en las muestras de leche analizadas como también en los derivados lácteos como del queso (Ingham, Becker, & Fanslau, 2003).

Por otro lado, un estudio realizado en la Universidad de Wisconsin, evaluó en varias granjas lecheras la prevalencia de *S. aureus* para así poder estimar la sensibilidad de la prueba 3M™ Petrifilm™ (78 a 90%) por cada 0.1 mL de leche bovina. Por medio de esta prueba se delimitó su efectividad con relación a su pico máximo de reconocimiento de patógenos, que fueron de 100 UFC/mL en muestras aisladas de leche. Sin embargo, las mismas sufrieron una reducción a 1 UFC/ml debido a cortos tiempos de incubación de las muestras generando un decrecimiento en su población total, como se observa en la tabla 7. Además el porcentaje de microorganismos presentes tanto en glándulas mamarias infectadas como en la piel presentan un esquema intermitente de desprendimiento de *S. aureus* (Sears, Smith, English, Herer, & Gonzalez, 1990; Silva, Caraviello, Rodrigues, & Ruegg, 2005).

En un estudio realizado por Varela-Ortiz se evaluó la susceptibilidad antibiótica de *S.aureus* en mastitis subclínica bovina, demostrando en sus resultados un grado de resistencia del 66% frente a ampicilina y 81% a tetraciclina (ver figura 16), valores muy similares a los obtenidos en la leche de burra. Por otro lado, los datos de la misma investigación revelaron una baja sensibilidad a gentamicina (44-58%) en comparación a la alta sensibilidad en la leche de burra (figura 13). En el análisis de Varela-Ortiz se refleja una gran tasa de resistencia relacionada al grupo de antibióticos betalactámicos en comparación al bajo porcentaje de resistencia (figura 6 y figura 7) obtenido en leche cruda de burra, que podría estar vinculado a la actividad lisozomal previamente descrita en la investigación (Varela-Ortiz *et al.*, 2018).

En cambio, Leon-Galvan *et al.* (2015) analizaron en México la sensibilidad y detección molecular de antibióticos en hatos lecheros bovinos, en el cual se reportaron seis aislamientos (54.54%) de microorganismos bacterianos, y se detectó principalmente resistencia a penicilinas como clindamicina (80%) y ampicilina (70%). En este estudio se encontró un alto porcentaje de bacterias resistentes en muestras de mastitis subclínica de distintos rebaños, sin embargo un 90% de muestras presentaron alta sensibilidad a ciprofloxacina, dicloxacilina y gentamicina. Además, el porcentaje de resistencia hacia ampicilina es muy similar a informes obtenidos en rebaños lecheros del sur de Brasil (67.4%), es común que se den estos valores debido a que los granjeros emplean dosis profilácticas de antibióticos en la ubre para la prevención de mastitis (Leon-Galvan *et al.*, 2015).

A pesar de que varios estudios demuestran el riesgo de ETA's vinculado a bacterias, la leche sigue siendo un medio fácil de contaminación, en este aspecto Chye, Abdullah & Ayob (2004, p. 540) recalcan en su investigación, que la mala higiene personal y la contaminación del agua, son los principales factores que afectan la calidad e inocuidad de la leche. En dicha investigación se analizaron 930 muestras de leche cruda bovina en distintas regiones de Malasia, en la cual se determinó que un 61% de las muestras eran positivas para *S.aureus*, con una incidencia mayor en el sur de Malasia (63%) que en el norte del país (56%), relacionado a técnicas de ordeño inadecuadas por malas prácticas de higiene.

Asimismo, la aparición de la bacteria era infrecuente en regiones donde se practicaban medidas adecuadas relacionadas al control del agua y operaciones de desinfección post ordeño. Sin embargo, la tasa de aislamiento de *Staphylococcus* es mucho más baja en países tropicales (Adesiyun, 1994; Chye, Abdullah, & Ayob, 2004).

A partir de un meta análisis realizado en China entre 2007-2017, acerca de los patrones de resistencia antibiótica en *S.aureus* aislados, se determinó que la tasa de prevalencia colectiva de *Staphylococcus* presentaba una alta resistencia a betalactámicos como ampicilina (72%), eritromicina (41%), penicilina G (87%) y oxacilina (97%), siendo su origen principal los productos informales comercializados por minoristas (Jia *et al.*, 2019). Esto se vincula al estudio actual, debido al método de comercialización similar que exhibe la LB, por lo que su resistencia a betalactámicos muestra patrones afines a la investigación realizada en China y Malasia.

Sin embargo, autores como Wang, Wang, Su, & Xu, (2019) corroboran la presencia de ETA's en varias escuelas distribuidas a largo de los cantones de China, durante 2017-2018, y demostraron así, la existencia de *S.aureus* en diferentes alimentos que se consumen en estas instituciones, como también la necesidad de realizar trazabilidad acerca de los alimentos contaminados. De la misma forma, Jia *et al.*, (2019) y Wakabayashi *et al.*, (2018) demostraron en sus estudios, que la contaminación provenían de alimentos minorista en China, siendo los más susceptibles a ETA's. Estos tienen como consecuencia la transmisión de enfermedades bacterianas y por lo tanto pueden desencadenar en la resistencia a los distintos antibióticos (Sato'o *et al.*, 2014; Wakabayashi *et al.*, 2018; Wang, Wang, Su, & Xu, 2019) .

4.6 Limitantes del estudio

Al momento, el estudio es el único realizado en Ecuador, que identificó *Staphylococcus* en leche cruda de burra comercializada de manera informal en sur de Quito. Se generaron diversas limitantes que no ayudaron a complementar información de utilidad para la presente investigación.

- La población de burros en Ecuador no se encuentra definida debido que son una especie netamente doméstica de trabajo y su producción lechera es de baja importancia.
- Definir la población de muestreo requirió de varias semanas hasta identificar cada animal y establecer el número exacto que poseía cada productor, ya que su número variaba todos los días.
- La comercialización al ser informal no presentan registros de ningún tipo, lo que dificultó la obtención de información adicional para el presente estudio.
- La literatura acerca de burros y su descripción como especie es muy limitada y desactualizada.
- Gran parte de la información hallada en artículos científicos acerca de la leche de burra se orientaba mayormente en características, composición o propiedades de su conservación y en poca proporción acerca de bacterias presentes en su leche.
- Los productores tienen desconfianza de compartir información acerca de las burras debido a problemas con autoridades metropolitanas y el miedo a comprometer su actividad económica.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se logró identificar 5 puntos de comercialización de leche cruda de burra en el sur de Quito, donde se encontraron 15 muestras positivas a *Staphylococcus*, así como el desarrollo de 6 especies frente al 3M™ Petrifilm™ que representaron el 37.5% de muestras positivas dentro de la investigación.

A pesar de esto las especies de *Staphylococcus* que manifestaron mayor prevalencia fueron: *S.aureus* y *S. epidermis*. De las muestras valoradas en las dos etapas del estudio el nivel de UFC que se generó fue de 1 a 64 UFC/ml, siendo estos los rangos extremos con mayor utilidad para la valoración del riesgo hacia el consumidor, lo que significa que esta carga obtenida es limitada para generar un efecto hacia la salud del consumidor debido a que las bacterias identificadas variaron entre los muestreos y pudo deberse a factores alterados por la manipulación de los productores al momento del ordeño o factores no contemplados en la investigación.

En base al análisis mediante tiras reactivas se determinó la no presencia de tetraciclinas, sulfonamidas y betalactámicos, lo que no representa un riesgo hacia la salud humana. Sin embargo, la multiresistencia presentada por las 6 especies de *Staphylococcus*, reveló resistencia frente a antibióticos como: ampicilina, amoxicilina más ácido clavulánico y tetraciclina.

Por lo cual se concluye que la multiresistencia es una consecuencia del mal uso de antibióticos, que es un parámetro difícil de ser controlado en sistemas extensivos o de traspatios. El escenario de la multiresistencia se replica en varios países tales como: Brasil, China, Estados Unidos, Ecuador, Malasia, México entre muchos otros, coincidiendo con el presente estudio en que los niveles residuales de antibióticos que se obtuvieron en la leche cruda de burra no fueron concluyentes para ser considerados como un producto que sobrepase los límites de residuos definidos por el Codex Alimentario y por lo tanto enferme a la población.

5.2. Recomendaciones

- Realizar análisis específicos de las especies bacterianas resistentes halladas en la investigación y así determinar el factor desencadenante para genes de resistencia.
- Realizar futuras investigaciones que establezcan el origen de contaminación que se halló en la leche de burras, valorando si se debe a características propias del animal o por factores de manipulación de los productores.
- Complementar la investigación con un estudio nutricional de la leche de burra evaluando su consumo posterior a un correcto proceso de saneamiento en la etapa de ordeño y evaluar sus efectos secundarios de su consumo.
- Determinar la existencia de antibióticos que no fueron valorados en esta investigación, con el fin de alcanzar una valorización más completa de las posibles trazas de antibióticos presentes en la leche de burra.
- Evaluar mediante una investigación el impacto que puede llegar a generar el consumo de esta leche en personas con (adultos mayores, niños o intolerantes).
- Analizar las posibles enfermedades que se pueden llegar a manifestar por falta de desinfección de la ubre, por ejemplo casos de mastitis.

REFERENCIAS

- Adesiyun, A. A. (1994). Bacteriological quality and associated public health risk of pre-processed bovine milk in Trinidad. *International Journal of Food Microbiology*, 21(3), 253-261. doi:[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90032-9)
- AOAC. (2006). Guía de interpretación 3M Petrifilm Placas para recuento de *Staphylococcus*. *Official Method 2003.08 para recuento de Staphylococcus*.
- Bes, M., Saidi Slim, L., Becharnia, F., Meugnier, H., Vandenesch, F., Etienne, J., & Freney, J. (2002). Population diversity of *Staphylococcus intermedius* isolates from various host species: typing by 16S-23S intergenic ribosomal DNA spacer polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 40(6), 2275-2277. doi:10.1128/jcm.40.6.2275-2277.2002
- Bučević-Popović, V., Delas, I., Međugorac, S., Pavela-Vrančić, M., & Kulišić-Bilušić, T. (2014). Oxidative stability and antioxidant activity of bovine, caprine, ovine and asinine milk. *International Journal of Dairy Technology*, 67. doi:10.1111/1471-0307.12126
- CDC. (2017). Leche cruda. *Centers for Disease Control and Prevention*. Recuperado el 15 de julio del 2019 de: <https://www.cdc.gov/spanish/especialescdc/lechecruda/index.html>
- Chye, F. Y., Abdullah, A., & Ayob, M. K. (2004). Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology*, 21(5), 535-541. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.11.007>
- Climate-Data.org. (2018). Clima Quito. Retrieved from <https://es.climate-data.org/america-del-sur/ecuador/provincia-de-pichincha/quito-1012/>
- Coimbra, E. S. V., Rossi, C. C., Jesus-de Freitas, L. J., Brito, M., Laport, M. S., & Giambiagi-deMarval, M. (2019). Short communication: Diversity of species and transmission of antimicrobial resistance among *Staphylococcus* spp. isolated from goat milk. *J Dairy Sci*, 102(6), 5518-5524. doi:10.3168/jds.2018-15723
- Colavita, G., Amadoro, C., Rossi, F., Fantuz, F., & Salimei, E. (2016). Hygienic characteristics and microbiological hazard identification in horse and donkey raw milk. *Vet Ital*, 52(1), 21-29. doi:10.12834/VetItl.180.545.1

- Cunsolo, V., Cairone, E., Fontanini, D., Criscione, A., Muccilli, V., Saletti, R., & Foti, S. (2009). Sequence determination of α s1-casein isoforms from donkey by mass spectrometric methods. *44*(12), 1742-1753. doi:10.1002/jms.1683
- Cunsolo, V., Saletti, R., Muccilli, V., Gallina, S., Di Francesco, A., & Foti, S. (2017). Proteins and bioactive peptides from donkey milk: The molecular basis for its reduced allergenic properties. *Food Res Int*, *99*, 41-57. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.002
- Dewey-Mattia, D., Manikonda, K., Hall, A. J., Wise, M. E., & Crowe, S. J. (2018). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 2009-2015. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002)*, *67*(10), 1-11. doi:10.15585/mmwr.ss6710a1
- FDA. (2018). *Los peligros de la leche cruda*. Recuperado el 20 de diciembre del 2019 de: <https://www.fda.gov/media/119384/download>
- Futagawa-Saito, K., Ba-Thein, W., & Fukuyasu, T. (2007). High occurrence of multi-antimicrobial resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates from healthy and diseased dogs and domesticated pigeons. *Research in Veterinary Science*, *83*(3), 336-339. doi:https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.01.013
- Ingham, S. C., Becker, K. L., & Fanslau, M. A. (2003). Comparison of the Baird-Parker agar and 3M Petrifilm Staph Express Count plate methods for enumeration of *Staphylococcus aureus* in naturally and artificially contaminated foods. *J Food Prot*, *66*(11), 2151-2155. doi:10.4315/0362-028x-66.11.2151
- Jia, K., Fang, T., Wang, X., Liu, Y., Sun, W., Wang, Y., . . . Dong, Q. (2019). Antibiotic Resistance Patterns of *Staphylococcus aureus* Isolates from Retail Foods in Mainland China: A Meta-Analysis. *Foodborne Pathog Dis*. doi:10.1089/fpd.2019.2686
- Kadariya, J., Smith, T. C., & Thapaliya, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *Biomed Res Int*, *2014*, 827965-827965. doi:10.1155/2014/827965
- Leon-Galvan, M. F., Barboza-Corona, J. E., Lechuga-Arana, A. A., Valencia-Posadas, M., Aguayo, D. D., Cedillo-Pelaez, C., . . . Gutierrez-Chavez, A. J. (2015). Molecular detection and sensitivity to antibiotics and

- bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herds of central Mexico. *Biomed Res Int*, 2015, 615153. doi:10.1155/2015/615153
- Li, L., Liu, X., & Guo, H. (2018). The nutritional ingredients and antioxidant activity of donkey milk and donkey milk powder. *Food Sci Biotechnol*, 27(2), 393-400. doi:10.1007/s10068-017-0264-2
- Luo, J. (2019). Thermal instability and characteristics of donkey casein micelles. *Food Research Internacional*, doi:10.1016/j.foodres.2019.1002.1023.
- Malaver, G. C. (2016). *Identificación de coliformes presentes mediante el test de índice analítico de perfil 20 E (API® 20 E), en la leche cruda de cabras que es expendida por vendedores ambulantes en el sur de la ciudad de Quito.*, Universidad de la Americas,
- Martini, M., Altomonte, I., Licitra, R., & Salari, F. (2018). Nutritional and Nutraceutical Quality of Donkey Milk. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 33-37. doi:https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.10.020
- Martini, M., Salari, F., Altomonte, I., Ragona, G., Piazza, A., Gori, R., . . . Brajon, G. (2018). Effects of pasteurization and storage conditions on donkey milk nutritional and hygienic characteristics. *Journal of Dairy Research*, 85(4), 445-448. doi:10.1017/S0022029918000687
- Murgia, A., Scano, P., Contu, M., Ibba, I., Altea, M., Bussu, M., . . . Caboni, P. (2016). Characterization of donkey milk and metabolite profile comparison with human milk and formula milk. *LWT*, 74, 427-433. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.070
- Nam, Y.-D., Chung, W.-H., Seo, M.-J., Lim, S.-I., & Yi, S.-H. (2012). Genome sequence of *Staphylococcus lentus* F1142, a strain isolated from Korean soybean paste. *Journal of bacteriology*, 194(21), 5987-5987. doi:10.1128/JB.01484-12
- Otto, M. (2014). *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis. *Methods Mol Biol*, 1106, 17-31. doi:10.1007/978-1-62703-736-5_2
- Pahissa. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*: MARGE BOOKS.
- Quagliariello, C. J. A. (2017). Le recours contemporain au lait d'ânesse: regards croisés entre les mères, les pédiatres et les éleveurs. 52(1), 121-131.
- Šarić, L. Ć., Šarić, B. M., Mandić, A. I., Torbica, A. M., Tomić, J. M., Cvetković,

- D. D., & Okanović, Đ. G. (2012). Antibacterial properties of Domestic Balkan donkeys' milk. *International Dairy Journal*, 25(2), 142-146. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.03.007>
- Sato'o, Y., Omoe, K., Naito, I., Ono, H. K., Nakane, A., Sugai, M., . . . Hu, D.-L. (2014). Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. *Journal of clinical microbiology*, 52(7), 2637-2640. doi:10.1128/JCM.00661-14
- Sayari, A., Agrebi, N., Jaoua, S., & Gargouri, Y. (2001). Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus simulans* lipase. *Biochimie*, 83(9), 863-871. doi:[https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01327-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01327-X)
- Sears, P. M., Smith, B. S., English, P. B., Herer, P. S., & Gonzalez, R. N. (1990). Shedding Pattern of *Staphylococcus aureus* from Bovine Intramammary Infections. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 2785-2789. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78964-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78964-3)
- Silva, B. O., Caraviello, D. Z., Rodrigues, A. C., & Ruegg, P. L. (2005). Evaluation of Petrifilm for the Isolation of *Staphylococcus aureus* from Milk Samples. *Journal of Dairy Science*, 88(8), 3000-3008. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72980-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72980-5)
- Stanchi, N. O., Martino, P. E., Gentilini, E., Reinosos, E. H., & Echeverría, M. G. (2007). *Microbiología Veterinaria: Inter-Médica*.
- Switaj, T. L., Winter, K. J., & Christensen, S. R. (2015). Diagnosis and Management of Foodborne Illness. *Am Fam Physician*, 92(5), 358-365.
- Trinchese, G., Cavaliere, G., Canani, R. B., Matamoros, S., Bergamo, P., De Filippo, C., . . . Mollica, M. P. (2015). Human, donkey and cow milk differently affects energy efficiency and inflammatory state by modulating mitochondrial function and gut microbiota. *J Nutr Biochem*, 26(11), 1136-1146. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.05.003
- Unisensor. (2016). TriSensor Milk BTS MRL 96 tests - KIT035. Recuperado el 18 de agosto del 2019 de: <https://unisensor.be/products/KIT035>
- Vanderhaeghen, W., Piepers, S., Leroy, F., Van Coillie, E., Haesebrouck, F., & De Vliegher, S. (2014). Invited review: effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *J Dairy Sci*, 97(9), 5275-5293. doi:10.3168/jds.2013-7775
- Varela-Ortiz, D. F., Barboza-Corona, J. E., Gonzalez-Marrero, J., Leon-Galvan,

- M. F., Valencia-Posadas, M., Lechuga-Arana, A. A., . . . Gutierrez-Chavez, A. J. (2018). Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases and in vitro efficacy of bacteriophage. *Vet Res Commun*, 42(3), 243-250. doi:10.1007/s11259-018-9730-4
- Varga, L. (2007). Microbiological quality of commercial dairy products. *Communicat. Current Res. Educat. Topics Trends Applied Microbiol.*
- Vincenzetti, S., Foghini, L., Pucciarelli, S., Polzonetti, V., Cammertoni, N., Beghelli, D., & Polidori, P. (2014). Hypoallergenic properties of donkey's milk: a preliminary study. *Vet Ital*, 50(2), 99-107. doi:10.12834/VetIt.219.125.5
- Wakabayashi, Y., Umeda, K., Yonogi, S., Nakamura, H., Yamamoto, K., Kumeda, Y., & Kawatsu, K. (2018). Staphylococcal food poisoning caused by *Staphylococcus argenteus* harboring staphylococcal enterotoxin genes. *Int J Food Microbiol*, 265, 23-29. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.022
- Wang, W., Wang, L., Su, J., & Xu, Z. (2019). Antibiotic Susceptibility, Biofilm-Forming Ability, and Incidence of Class 1 Integron of *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* Isolated from Various Foods in a School Canteen in China. *Foodborne Pathog Dis.* doi:10.1089/fpd.2019.2694
- Whitehead, J., & Lake, B. (2018). Recent Trends in Unpasteurized Fluid Milk Outbreaks, Legalization, and Consumption in the United States. *PLoS currents*, 10, ecurrents.outbreaks.bae5a0fd685616839c685616839cf857792730d685616831. doi:10.1371/currents.outbreaks.bae5a0fd685616839c9cf857792730d1

ANEXOS

Anexo 1. Selección e identificación de animales



Anexo 2. Recolección y rotulación de las muestras



Anexo 3. Procesamiento de muestras en laboratorio

