



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DETERMINACIÓN DE PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS POR TIRAS
REACTIVAS Y DE *E. COLI* MEDIANTE CULTIVO EN LECHE CRUDA DE
BURRA COMERCIALIZADA EN EL SUR DE QUITO.

AUTOR

David Alejandro Basantes Flores

AÑO

2020



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DETERMINACIÓN DE PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS POR TIRAS
REACTIVAS Y DE *E. COLI* MEDIANTE CULTIVO 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 Zootecnista

Profesor Guía

David Francisco Andrade Ojeda

Autor

David Alejandro Basantes Flores

Año

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Determinación de presencia de antibióticos por tiras reactivas y de *E. Coli* mediante cultivo en leche cruda de burra comercializada en el sur de Quito, a través de reuniones periódicas con el estudiante David Alejandro Basantes Flores, en el semestre 2020-2, 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”.

A handwritten signature in blue ink, reading "David Francisco Andrade Ojeda". The signature is stylized with large loops and is written over a horizontal line.

David Francisco Andrade Ojeda
Médico Veterinario Zootecnista MgSc. Tecnología de Alimentos
C.I. 171269316-5

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Determinación de presencia de antibióticos por tiras reactivas y de *E. Coli* mediante cultivo y antibiograma en leche cruda de burra comercializada en el sur de Quito, del estudiante David Alejandro Basantes Flores, en el semestre 2020-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.



Francisco Javier Jaramillo Cisneros MSc.

Doctor en Veterinaria y Zootecnia

C.I. 1711695849

DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mí 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”.



David Alejandro Basantes Flores

C.I. 1719211102

RESUMEN

Parte de la población del sur de Quito atribuye creencias curativas a la leche de burra por lo que el consumo de la misma ha ido incrementando, encontrando varios puntos de expendio informal de leche cruda, la cual al ser consumida sin procesos de pasteurización y sin un protocolo higiénico se convierte en un riesgo a la salud del consumidor. El objetivo del presente estudio es detectar la presencia de tetraciclina, estreptomicina y betalactámicos mediante tiras reactivas e identificar la presencia de Enterobacterias que representan un riesgo relacionado a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), para lo cual se procesaron en el laboratorio Livexlab 40 muestra de leche cruda de burra, de una población de 20 animales, colectadas directamente en puntos de expendio informales, las muestras fueron sometidas a la prueba TriSensor® por tiras reactivas y cultivos bacterianos mediante 3M™ Petrifilm™ para detectar enterobacterias. El resultado obtenido fue negativo en su totalidad de muestras en la detección de antibióticos y de igual manera negativos en su totalidad de muestras en la detección de Enterobacterias, estos resultados negativos imposibilitan realizar pruebas de sensibilidad y resistencia bacteriana por lo que no se realizaron en este estudio.

La ausencia de trazas de antibióticos puede relacionarse al no usar estos antibióticos analizados, y el resultado negativo al crecimiento de enterobacterias puede atribuirse a las características antibacterianas de la leche de burra, se considera por lo tanto que el consumo de leche cruda de burra representa un riesgo limitado hacia la salud del consumidor.

Se evidenció la ausencia total de betalactámicos, tetraciclinas y estreptomicinas, por lo tanto, se concluye que no representa un riesgo de salud hacia el consumidor con relación a los tres antibióticos examinados, tampoco hubo crecimiento mediante el cultivo en placas de 3M™ Petrifilm™ de enterobacterias, lo que se concluye que no se relaciona el consumo de leche cruda de burra con ETAS por enterobacterias y no se pudo realizar las pruebas de resistencia o sensibilidad de antibióticos y esto se debe a que no hubo crecimiento de enterobacterias en ninguna de las muestras recolectadas en el sur de Quito.

ABSTRACT

This study concentrates in a significant part of the population in the south of Quito that attributes curative beliefs to donkey's milk, making its consumption increasing over the years. As a consequence, there are several informal outlets that distribute the donkey's raw milk without any pasteurization processes or hygienic protocol, resulting into a risk to consumer health. The objective of this study is to detect the presence of tetracycline, streptomycin and beta-lactams using test strips and to identify the presence of Enterobacteriaceae that represent a risk related to food-borne diseases (ETA's). To prove the following, Livexlab 40 samples were processed in the laboratory of raw donkey milk, from a population of 20 animals collected directly at informal outlets. The samples were subjected to the TriSensor® test by dipstick and bacterial cultures using 3M™ Petrifilm™ to detect Enterobacteriaceae.

The results obtained were negative in its entirety of samples in the detection of antibiotics and of samples in the detection of Enterobacteriaceae. The negative results make it impossible to perform bacterial sensitivity and resistance tests, therefore they were not carried out in this study.

The absence of traces of antibiotics can be related to not using these analyzed antibiotics, and the negative result for the growth of enterobacteria can be attributed to the antibacterial characteristics of donkey milk, therefore it is considered that the consumption of raw donkey milk represents a limited risk to consumer health.

The total absence of beta-lactams, tetracyclines and streptomycins was evidenced that it does not represent a health risk towards the consumer in relation to the three antibiotics examined, nor was there growth by culturing in 3M™ Petrifilm™ plates of Enterobacteriaceae. This concludes that the consumption of raw donkey milk is not related to ETAS by Enterobacteriaceae and because of its no-growth in any of the samples collected in the south of Quito, antibiotic resistance or sensitivity tests could not be performed either.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos.....	3
1.1.1. Objetivo General.....	3
1.1.2. Objetivo Específico	3
1.2. Pregunta de Investigación.....	4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	5
2.1. Anatomía y Fisiología de la Glándula Mamaria	5
2.2. Características de la leche de burra	6
2.3. Bacterias contaminantes de la leche	10
2.3.1. Salmonella.....	11
2.3.2. Serratia	12
2.3.3. Citrobacter	13
2.3.4. Proteus	15
2.3.5. Shigella.....	15
2.3.6. Klebsiella	17
2.3.7. Yersinia.....	18
2.3.8. Enterobacter	19
2.3.8.1. Escherichia coli	20
2.4. Aislamiento bacteriano	23
2.4.1. Agar MacConkey	24
2.4.2. Agar Nutritivo	24
2.4.3. Agar Manitol.....	25
2.4.4. Prueba Voges Proskauer.....	26
2.4.5. Prueba Rojo de Metilo	27
2.4.6. Prueba de Indol	28
2.5. Detección de antibióticos en leche.....	28
2.5.1. Trisensor.....	28
2.6. Consumo de leche cruda relacionada con ETA´s.....	29
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	30

3.1. Ubicación	30
3.2. Población y muestra	31
3.2.1 Variables de estudio	33
3.3. Materiales	33
3.3.1. De campo	33
3.3.2. De laboratorio	34
3.2.3 De oficina.....	35
3.4. Metodología	35
3.4.1. Toma de muestras.....	36
3.4.2. Método analítico Trisensor para la detección de antibiótico en leche cruda por tiras reactivas.....	38
3.4.3. Método analítico para recuento de <i>E. coli</i> mediante Petrifilm en leche cruda	39
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1. Resultados.....	40
4.1.1. Identificación de antibióticos en leche	40
4.1.2. Identificación Bacteriana.....	40
4.1.3. Antibiograma.....	40
4.2. Discusión	40
4.3. Limitantes	43
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
5.1. Conclusiones	44
5.2. Recomendaciones.....	44
REFERENCIAS	45
ANEXOS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Interpretación de kit analítico de tiras reactivas Trisensor.....	29
<i>Figura 2.</i> Sectorización. Localización de sectores para recolección de muestras de leche cruda de burra en el surde quito marcado con números.....	31
<i>Figura 3.</i> Diagrama de recolección de muestras de laboratorio	36
<i>Figura 4.</i> Diagrama de metodología para la detección de antibióticos en leche por Trisensor tiras reactivas.	38
<i>Figura 5.</i> Diagrama de análisis de placas 3M™ Petrifilm™ para análisis.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Sectores y su dirección para el desarrollo de la investigación.....</i>	30
Tabla 2. <i>Asignación de códigos en base a la localización y animal muestreado</i>	32

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Las burras son esenciales para la actividad económica en las zonas semiáridas y montañosas de varias partes del mundo, el uso de su leche fue conocido desde la época romana como un remedio común, es así que a finales de los años 90 fue usada con éxito para alimentar a infantes en orfanatos de Francia (Nayak C Madhusudan, 2017).

En un estudio realizado en el 2017, en Italia, se caracterizaron las colonias bacterianas presentes en la leche de burra determinando varios géneros de bacterias Gram negativas, entre los más prevalentes *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Citrobacter*, *Sphingobacterium*. El estudio indicó que la cantidad de bacterias Gram negativas en la leche de burra es superior a otras leches, sin embargo, podría estar influenciado por componentes individuales de la raza (Maria de los Dolores Soto del Rio, 2017).

Otro estudio realizado en el 2018 para detectar las micotoxinas por medio de inmunoanálisis en la leche de burra determinó que se pueden dar muchos falsos positivos debido a su alto contenido de lisozima que pueden ejercer actividad inhibitoria en varios sistemas de inmunoensayo, por ellos se recomienda la validación específica de cada sistema y de la misma forma un nuevo análisis una vez hecho el tratamiento térmico de aquellas muestras positivas al inmunoensayo (Gottschalk, 2018).

En la ciudad de Quito la leche de burra ha tomado una gran acogida por parte de los habitantes en las zonas del sur principalmente, las personas aprovechan las cualidades nutritivas y curativas de la misma atribuyéndole poderes curativos en especial para afecciones respiratorias (La Hora, 2008).

Si bien la leche de burra ha ganado su sitio en el mercado de Quito, ha sido la leche de cabra la que desde hace algunos años se ha venido expendiendo con mayor regularidad en varios sitios de la ciudad de Quito, sobre todo por la facilidad de manejo de los animales y la misma creencia entre las personas de

sus propiedades curativas al aliviar problemas respiratorios e incluso anemia (Comercio, 2012).

Un Estudio realizado en el 2016 identificó la presencia de coliformes en la leche no pasteurizada de cabras que es expandida comerciantes en el sur de las calles de Quito, El estudio identificó a la bacteria *Escherichia spp* como el principal patógeno relacionado con las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), simultáneamente fueron realizadas pruebas para identificar la presencia de antibióticos, en las cuales fueron positivas las pruebas a la presencia de tetraciclinas, este hallazgo presenta una problemática a nivel de salud pública al ser un factor para la resistencia bacteriana en humanos, lo cual estaría reflejando un uso indiscriminado de antibióticos por parte de los productores o tiempos de retiro muy escasos (Malaver Marval, 2016).

Varias patologías que se presentan en burras en estado de lactancia son resueltas de manera incorrecta con antibióticos, presentando residuos en la leche, y estos pueden representar un riesgo para el consumidor y altera características de la leche por lo que se deben manejar rangos mínimos de antibióticos en leche (Tumini, 2019).

El muestreo de la leche cruda de burra se lo llevó a cabo a nivel de los sectores urbano marginal del sur de Quito en un período de dos semanas en el año 2019. La investigación involucró 40 muestras las cuales fueron procesadas Livexlab. El monto económico para la realización del proyecto fue de 632 dólares; el investigador contó con los recursos necesarios para realizar el análisis del número de muestras. El proceso de análisis se basó en la recepción de muestras en el punto de venta de la leche, almacenamiento y transporte de estas al laboratorio, cultivo en secuencia de agares correspondientes y Placas M petrifilm, aislamiento con agares selectivos y específicos de coliformes, análisis de rastros de antibióticos mediante tiras reactivas y su interpretación.

La tarea de identificar residuos de antibióticos en leche cruda de burra, así como de *E. coli*, es de suma importancia, esto permite evaluar la calidad de la leche comercializada en las calles del sur de Quito por el bienestar del consumidor que

es el principio de la salud pública, esta información no solo ayuda al consumidor, sino también al productor para mejorar su producto y su expendio.

La leche de burra representa una nueva estrategia de manipulación de microbiotas al hacer uso de esta como una dieta específica, debido a que la leche de burra se caracteriza por presentar un nivel elevado de péptidos antimicrobianos, por lo que resulta ser una opción para la reducción del daño causado por la ileitis. Existe presencia de alto niveles de péptidos antimicrobianos como la lisozima y lactoferrina, representan el 20 y 5% respectivamente de las proteínas solubles totales, estos péptidos son los encargados de proveer propiedades antibacterianas, antitumorales y antiproliferativas en células de cáncer de pulmón humano (Yvon, y otros, 2018).

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

Determinar la presencia de antibióticos mediante tiras reactivas (TRISENSOR) y de *E. coli* mediante cultivo en leche cruda de burra comercializada en el sur de Quito para verificar su calidad higiénica.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Detectar la presencia de tetraciclina, estreptomycinina y betalactámicos mediante el uso de tiras reactiva de inmunocromatografía.
- Identificar la presencia de *E. coli* mediante el conteo de UFC en las muestras de leche cruda de burra tomadas en la ciudad de Quito para relacionarlas con ETAS.
- Evaluar la resistencia o sensibilidad a diferentes antibióticos de las colonias de *E. coli* aisladas de leche de burra con presencia de antibióticos, mediante pruebas de antibiograma por sensibilización para determinar si son innatas o adquiridas.

1.2. Pregunta de Investigación

¿Existe la presencia de trazas de antibióticos y de *Escherichia coli* multirresistente en leche cruda de burra que se expende en el sur de Quito?

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Anatomía y Fisiología de la Glándula Mamaria

La ubre se encuentra en la región inguinal y está conformada por dos glándulas independientes, las cuales son estructuras secretoras, constituidas por alveolos, encargados de la biosíntesis de la leche, la glándula cuenta con una cisterna donde se almacena la leche secretada, esta cisterna tiene contacto con el exterior por medio del pezón (Senger, 2005).

Los alveolos son considerados las unidades secretoras de leche y cada uno de ellos cuenta con irrigación de vénulas y microcapilares, el conjunto de alveolos formará un racimo (lobulillo), de cada lobulillo saldrá un conducto galactóforo directo a la cisterna la cual se encargará de almacenar la leche producida (Callejos, 2017).

La cisterna tiene conexión con el pezón por medio de un conducto, el conducto papilar, y hacia distal del conducto se encuentra el esfínter papilar, la roseta de fustemberg y el esfínter papilar son los encargados de proteger el ingreso de patógenos a la cisterna, así como la salida pasiva de la leche (Callejos, 2017).

La irrigación de la glándula mamaria se realiza a través de la arteria pudenda externa, la cual posteriormente toma el nombre de arteria mamaria, y en su trayectoria ya dentro de la glándula se bifurca en ramas arteriales que van directo al ganglio linfático supramamario, cuenta también con una ramificación mayor en arteriolas, con la finalidad de rodear a cada alveolo, al tejido conjuntivo y al pezón (Urroz, 2001).

Una vez realizada la irrigación al alveolo y otros tejidos, la sangre venosa va por vénulas hacia la vena subcutánea abdominal, que sale de la glándula y la continuación de esta es la vena mamaria que confluye en la vena cava craneal (Urroz, 2001).

La producción de la leche empieza a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), en la hipófisis se segrega: prolactina, que ayuda en el crecimiento de la glándula

mamaria durante la preñez, hormona somatotropina (STH), que controla el crecimiento glandular y estimula a los lactocitos, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que actúa a nivel sanguíneo, fusionando proteínas para la producción de leche, y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) que regula el metabolismo de la glándula (Hill R, 2006).

La sangre que rodea al alveolo capta los nutrientes necesarios como ácidos grasos, glucosa, aminoácidos, minerales, vitaminas, ácido β -hidroxibutírico, ácido acético, para que la leche se produzca en el epitelio alveolar, Los lactocitos son los encargados de cumplir entonces tres fases clínicas: 1) sintetizar la leche, 2) excreción de leche del alveolo hacia la cisterna y a su vez de la glándula y 3) el control del reposo cuando la cisterna está llena. (Callejos, 2017)

2.2. Características de la leche de burra

Considerado un alimento de alto valor proteico y sustituto para consumidores con problemas de intolerancia y alergias. La leche de burra se considera para uso pediátrico en niños que no asimilan leche bovina ya que la leche de burra presenta mayor digestibilidad a nivel vitamínico, de lípidos, proteínas y demás contenido mineral y al ser un compuesto altamente nutricional podría considerarse un ambiente ideal para la proliferación de microorganismos, pero esta leche se caracteriza por tener componentes antibacterianos como son las proteínas de protección y estabilidad de la leche, la asociación de inmunoglobulinas y lactoferrinas y el factor de defensa lisosomal que inhibe la proliferación bacteriana (Vincenzetti, 2014).

En algunos ámbitos de la salud se ha considerado a la leche de burra como un alimento alternativo para ciertos grupos como niños, pero también en geriatría y pacientes con ciertas patologías, ya que se ha demostrado en modelos experimentales una respuesta antitumoral, hipolipidémica y antiinflamatoria, según Martini: “existe la necesidad de verificación con mayor alcance a un mayor número de consumidores sensibles para llegar a ser válido como impacto positivo” (Martini S. A., 2018).

Dentro de las propiedades positivas que caracterizan a la leche de burra, se encuentra el alto contenido de lisozima, además de inmunoglobulinas, lactoferrina y lactoperoxidasa, propiedades que ejercen una actividad inmunorreguladora y antitumoral, pudiendo actuar sobre el tracto digestivo reduciendo la incidencia de gastroenteritis e infecciones intestinales (Sarti, y otros, 2019).

La leche de burra fermentada contiene distintos factores antimicrobianos protectores, que incluyen los péptidos liberados durante el proceso de digestión, los cuales pueden tener un efecto beneficioso sobre la salud intestinal para las personas con sistema inmune de defensa bajo, como ancianos, niños y pacientes convalecientes (Aspri, Leni, Galaverna, & Papademas, 2018).

En la leche de burra se encuentra presente microbiota propio de la leche, misma que puede normalizar la microbiota intestinal humana mediante efectos protectores en los sitios de la mucosa intestinal, llegando hasta a incluir la activación de células T reguladoras intestinales (Jirillo & Magrone, 2014).

La leche de burra contiene La lisozima que se trata de un glucósido hidrolasa, con actividad antimicrobiana frente a distintas bacterias, tiene capacidad de inhibir virus, parásitos y hongos. Esta enzima forma parte del sistema inmune innato y se encuentra presente en varias secreciones, entre ellas la leche. La lisozima es producida por macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Esta potente enzima es una de las principales fracciones de proteínas del suero en la leche de burra (Martini, Salari, Licitra, La Motta, & Altomonte, 2019).

La lisozima presente en la leche de burra ha mostrado una propiedad antimicrobiana parecida a los antibióticos sintéticos frente a ciertas cepas de bacterias grampositivas e incluso frente a la cepa gramnegativas. Así también los mismos estudios han demostrado que solamente la bacteria *Bacillus mojavensis* muestra resistencia a la lisozima (Cosentino, y otros, 2016).

Además de que la lisozima, agente antimicrobiano, puede contribuir a la inhibición del crecimiento bacteriano, tiene la capacidad de matar o inhibir un

amplio espectro de patógenos. La lisozima cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de los mucopolisacáridos en las paredes celulares bacterianas. La lisozima actúa de forma sinérgica con la lactoferrina e inmunoglobulinas en la actividad antimicrobiana (Cosentino, y otros, 2016).

Tras realizar investigaciones in vitro, se ha demostrado que la lisozima, presente en la leche de burra, ejerce una actividad antitumoral. El consumo diario de leche de burra con actividad de lisozima constante ha tenido efectos antiinflamatorios en un modelo de ileitis en ratones. El efecto antiinflamatorio depende de la lisozima constante y se asocia a la normalización de los niveles de péptidos antimicrobianos. Dicho esto, se ha propuesto que debe haber un alto contenido de lisozima constante en la leche de burra, para obtener efectos benéficos sobre la mucosa intestinal (Yvon, y otros, 2019).

La leche de burra cruda contiene componentes antimicrobianos como la lisozima, las inmunoglobulinas y la lactoferrina, mismas que mantienen bajos los niveles totales de bacterias, lo cual otorga a la leche una larga vida útil natural, ya que estos componentes pueden ejercer un efecto positivo sobre el almacenamiento de la leche cruda de burra. Cuando la leche de burra es empleada para el procesamiento de otros productos alimenticios, previene el crecimiento bacteriano y permite así extender de forma efectiva la vida útil de los productos alimenticios derivados de leche de burra (Yvon, y otros, 2019).

La lisozima es una enzima resistente a la temperatura, pese a ello, los tratamientos térmicos pueden reducir de forma significativa la actividad biológica de la enzima, estas reducciones pueden ir desde 21 hasta 74% (Yvon, y otros, 2019).

Existen estudios que muestran que la interacción entre la lisozima y la lactoferrina puede provocar una afectación sobre las propiedades antimicrobianas de la leche de burra. Las investigaciones reconocen a la leche de burra como un alimento seguro en términos de riesgo de salud e higiene, los riesgos de consumo de leche de burra son menores que los asociados al

consumo de leche de vaca, especialmente para bacterias como *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Campylobacter termo-tolerante* (Sarti, y otros, 2019).

La actividad de los péptidos está basada en la composición y secuencia de aminoácidos, mismos que pueden ejercer una amplia gama de actividades biológicas, como antimicrobianos, antihipertensivos, propiedades antioxidantes, antitrombóticas, inmunomoduladoras y opioides (Aspri, Leni, Galaverna, & Papademas, 2018).

La actividad de la lisozima de la leche de burra relacionada con la etapa de lactancia, la edad de los animales y el tratamiento de pasteurización ha sido estudiada. Concluyendo que, la etapa de la lactancia y la edad de los animales influyen en la actividad de la lisozima de la leche de burra, ya que la actividad enzimática es mayor en la lactancia temprana y en animales mayores a 15 años. Con respecto a la pasteurización, los autores indican que si la pasteurización es a bajas temperatura y a largo plazo no reduce la actividad de la lisozima (Martini, Salari, Licitra, La Motta, & Altomonte, 2019).

Es importante recalcar que, los niveles de la enzima lisozima, son dependientes principalmente de la etapa de lactancia y de la temporada productiva. Es decir, el mes de lactancia influye directamente la concentración de lisozima presente en la leche de burra, es así que en los primeros cuatro meses de lactancia se da la mayor concentración de lisozima, ocurriendo una reducción después de ese tiempo (Yvon, y otros, 2019).

Sin embargo, los informes realizados sobre la leche de burra han demostrado que existe una baja prevalencia de agentes causales de la mastitis en la leche proveniente de esta especie animal. Existen informes que han encontrado bacterias patógenas y ADN de protozoos en leche de burra, por lo que han recomendado el tratamiento térmico de la leche cruda con el objetivo de evitar el riesgo de contraer enfermedades transmitidas por el consumo de este alimento (Sarti, y otros, 2019).

En la leche las bacterias gramnegativas, se diferencian de las grampositivas, mostrando mayor resistencia a la lisozima, debido a que la capa de lipopolisacáridos de la membrana externa protege la pared celular de las bacterias. Por otro lado, ciertos estudios sugieren que algunos patógenos grampositivos pueden mostrar resistencia a la lisozima. Puede ocurrir de igual manera con ciertas gramnegativas, las cuales muestran sensibilidad a esta enzima, este hallazgo sugiere que los lipopolisacáridos podrían no ser el único medio para proteger a las bacterias frente a la acción enzimática de la lisozima, pudiendo existir otros mecanismos por los cuales la lisozima ejerce su efecto antimicrobiano, sin ser obstaculizado por los lipopolisacáridos. Es decir, el mecanismo exacto de la resistencia a la lisozima no es totalmente comprendido, por lo que puede variar dependiendo de la cepa o especie bacteriana (Cosentino, y otros, 2016).

Estudios realizados han evaluado in vitro las actividades inhibitorias de muestras fermentados de leche de burra antes y después de la digestión gastrointestinal, contra bacterias gram negativas como positivas. Los autores han llegado a la conclusión de que la actividad antimicrobiana es mayor para las muestras de leche fermentadas después de la digestión, reportándose la actividad antimicrobiana más notable contra *Listeria monocytogenes*, aunque fue observada también contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, sin reportar actividad antimicrobiana contra gramnegativas por la estructura compleja de la membrana externa de las bacterias. En vista de tales observaciones, los autores han inferido que la lisozima resiste la degradación dada por parte de las enzimas gastrointestinales (Aspri, Leni, Galaverna, & Papademas, 2018).

2.3. Bacterias contaminantes de la leche

Con frecuencia se observa la presencia de Enterobacterias en leche cruda en explotaciones que no cumplen con estándares de higiene, lo que representa un riesgo a la salud del consumidor, presentándose principalmente problemas gastrointestinales como es el caso de los efectos de la *Salmonella*. La leche

representa un medio ideal para la proliferación de bacterias patógenas, es de ahí que se considera un riesgo para la salud (Alais, 1985).

Otros síntomas que se presentan por leche contaminada de bacterias patógenas son fiebre, cefalea, vómitos y deshidratación, alergias, calambres, etc. Los grupos más vulnerables que son más recurrentes por ETA's son adultos mayores y niños, del total de afectados el 19% son por causa de *Salmonella* y el 15% de los afectados son por causa de *E. coli*. Los síntomas presentes por ETA's deben ser evaluados y controlados en los pacientes ya que si no lo hacen podrían desencadenar severos riesgos para la vida del paciente (CDC, 2004).

2.3.1. Salmonella

Considerada uno de los agentes con mayor relevancia debido al gran impacto en la salud pública y que se presenta con mayor frecuencia. Perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, el género salmonella se encuentra agrupada en las especies *S. entérica* y *S. bongori*, las cuales a su vez se dividen en más de 2500 serovariedades y se considera a *S. entérica* la de mayor importancia en temas de salud animal, así como también en salud humana y se compone de 6 sub especies (*s. entérica*, *S. salamae*, *S. indica*, *S. diarizonae*, *S. arizonae*, y *S. hountenae*) (ANMAT Administración Nacional de Medicamentos, 2015).

La *Salmonella* puede sobrevivir a temperaturas entre 7 a 49°C aunque también depende del medio en el que se encuentre y el serotipo, Son bacterias anaerobias facultativas que utilizan el citrato para su metabolismo, se caracterizan por no generar hemólisis cuando son cultivadas en agar sangre y dependiendo el serotipo y subclase comportarse de distinta manera frente a diferentes pruebas bioquímicas.

Salmonella tiene diferentes características patogénicas y puede presentarse en forma digestiva, causando gastroenteritis e intoxicaciones alimenticias, en forma septicémica, causando fiebre y tifoidea y otras formas menos frecuentes como osteítis y meningitis (Algorta, 2008).

Está presente en tracto intestinal de animales y seres humanos, formando parte de su flora intestinal, sin embargo, produce diarrea cuando es ingerida en alimentos contaminados con materia fecal, invade la mucosa intestinal, las células endoteliales del intestino por factores de adherencia y son capaces de lisar macrófagos y enterocitos (Grant, 2016).

Para diagnosticar Salmonelosis es necesario hacer una toma de muestras de alimentos o piensos, necropsias de animales, orina o sangre, dichas muestras pueden ser cultivadas en agare SS, agar MacConkey, agar Xilosa-lisina-desoxilato, las colonias resultantes de estos cultivos pueden ser sembradas en medios selectivos como verde brillante y para confirmar cepas específicas es necesario realizar pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares identificando los antígenos somáticos "O", flagelares "H" y los de virulencia "VI" (OIE, 2016).

2.3.2. Serratia

Las especies de *Serratia* son enterobacterias de tipo bacilos móviles, gram negativos, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y el género Klebsielleae (Sampson & Fisher, 1980). Algunas especies de este género producen prodigiosina, un pigmento rojo, no difusible e insoluble en agua (Grimont & Grimont, 1978).

Las especies de *Serratia* conocidas son *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plymuthic*, *S. marinorubra*, *S. anolium* (Grimont & Grimont, 1978). Otras conocidas son también *S. rubidaea* y *S. surfactantfaciens* (Clements, Ndlovu, Khan, & Khan, 2019).

El contenido, expresado en porcentaje, de moles de G+C del ADN de las especies de *Serratia* es generalmente de 54-60%. Con respecto al tamaño, se ha determinado el de la especie *S. marcescens*, el cual corresponde a 3.57 x 10⁹ Dalton (Grimont & Grimont, 1978).

Debido a que las especies *Serratia* pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, se caracteriza por la singularidad de regulación de aminoácidos de la familia del aspartato (Grimont & Grimont, 1978).

Las especies *S. marcescens* y *S. liquefaciens* han sido encontradas en agua residual, mientras que *S. marinorubra* ha sido encontrada en agua de mar y plancton (Grimont & Grimont, 1978).

Especies de *Serratia* se han asociado con animales vertebrados de sangre fría, como el lagarto cubano, lagartos iguánidos, lagartijas, tortugas, gallinas. Las gallinas, tras contaminar los huevos, ocasionan la muerte de los embriones de pollo, también se ha reportado canales de pollo contaminadas con *S. liquefaciens*. Ciertos casos en animales domésticos como, septicemia en potros, conjuntivitis en caballos, septicemia mortal en cabras y cerdos, abortos y mastitis crónicas en vacas, se han asociado a *Serratia*, ya que se ha observado leche pigmentada de rojo o con manchas rojas en la capa de crema de muestras provenientes de vacas con mastitis. *S. liquefaciens* fue descubierta en productos lácteos de vacas con mastitis crónica causada por esta especie de *Serratia* (Grimont & Grimont, 1978).

Las especies de *Serratia*, específicamente *S. marcescens*, han sido aisladas frecuentemente provenientes de fuentes humanas. Anteriormente, las especies de *Serratia* se consideraban saprofitos no patógenos, pese a ellos los estudios han demostrado que estos organismos se asocian a infecciones bacterianas graves, generalmente en pacientes hospitalizados y/o con compromiso vital. *S. marcescens* además de ser la especie más patógena, resulta también presentar mayor resistencia antimicrobiana (Sampson & Fisher, 1980).

Las afecciones conocidas, causadas por *Serratia*, son abscesos pulmonares, neumonía, empiema, otitis media, endocarditis, peritonitis, osteomielitis, artritis séptica, linfadenitis y septicemia. Son causantes de infecciones en el tracto urinario, piel, ojos y heridas (Sampson & Fisher, 1980).

2.3.3. Citrobacter

El género *Citrobacter* está compuesto por varias especies de enterobacterias, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, son gram-negativo, móviles, no formadoras de esporas, facultativamente anaeróbicas, son catalasa y oxidasa

negativas. Las colonias de este género de bacterias, tras la formación dada después de un tiempo de 48 horas a uC en agar tripticasa de soya, son translúcidas, brillantes y de un tamaño de diámetro aproximado de 1-2 mm. Son negativas a la prueba de Prokauer y producción de indol, positivas a la prueba de rojo de metilo, reducen el nitrato a nitrito (Clermont, y otros, 2015). Utilizan la fructosa-asparagina como fuente de carbono y nitrógeno, es decir como fuente de nutrientes (Sabag-Daigle, y otros, 2018).

Se caracterizan por su secuencia de porciones internas de genes *rpOb*, *fusA*, *pyrG*, *leuS* y secuenciación del gen 16S rRNA (Clermont, y otros, 2015). *Citrobacter* es un patógeno nosocomial de gran importancia, algunas especies han mostrado resistencia a múltiples fármacos. Son bacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y albergan el gen CTX-M (Mohan, Agarwal, Srivastava, & Singh, 2014).

Las especies conocidas del género *Citrobacter* son once, *C. freundii*, *C. amalonaticus*, *C. braakii*, *C. farmeri*, *C. gilleni*, *C. koseri*, *C. murlinae*, *C. rodentium*, *C. sedlakii*, *C. werkmanii* y *C. youngae* (Clermont, y otros, 2015). La identificación de este número de especies fue posible gracias a la realización de estudios relacionados al ADN permitiendo la separación en base a los perfiles bioquímicos (Brenner, y otros, 1993). La especie *C. rodentium* es un importante agente causal de enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo (Xia, y otros, 2019).

Las especies del género *Citrobacter*, se han considerado como bacterias que habitan en el sistema digestivo de humanos y de otros animales, pudiéndose encontrar también en diferentes hábitats ambientales (Clermont, y otros, 2015). Las especies de *Citrobacter*, bacilos gramnegativos, causan infecciones en pacientes comprometidos inmunológicamente (Oyeka & Antony, 2017). En el ser humano, se consideran como patógenos oportunistas, asociadas a infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas, a neumonía, abscesos, septicemia, meningitis, endocarditis y diarrea (Clermont, y otros, 2015). Son clínicamente importantes debido a que son patógenos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), la preocupación radica sobre el fracaso que

representa el tratamiento con cefalosporinas (Mohan, Agarwal, Srivastava, & Singh, 2014).

Las infecciones bacterianas causadas en animales mamíferos no son ampliamente reportadas, la limitada información muestra septicemia y encefalitis en ovejas causada por *C. freundii*, reportando un alto índice de mortalidad (Liu, Zhao, Xue, Ding, & Xue, 2018). *C. rodentium* es un patógeno causante de infecciones bacterianas con una mortalidad y morbilidad severa en pacientes mamíferos con un sistema inmune comprometido (Xia, y otros, 2019).

2.3.4. Proteus

Bastones Gram negativos, anaerobios facultativos que normalmente no fermentan lactosa, son oxidasa negativos, ureasa positiva, no poseen capsula ni esporulan, crecen en medios poco selectivos formando capas diseminadas (efecto swarming) y esto se debe a su gran motilidad ya que contienen flagelos peritricos. (Puerta-García, 2014).

Aunque existen muchas especies de *Proteus*, las subespecies más importantes son *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri* y *P. hauseri*. Estas son las encargadas de producir un 6% de enfermedades nosocomiales. (Public Health Agency of Canada, 2011).

2.3.5. Shigella

Las especies de *Shigella* son enterobacterias, bacilos gramnegativos, no formadoras de esporas, son anaerobias facultativas, están estrechamente relacionadas con *Escherichia coli*. Estas especies han servido como patógenos modelos para el estudio de patogénesis bacteriana (Schnupf & Sansonetti, 2019). Forman parte de la familia Enterobacteriaceae y causan diarrea aguda en humanos y animales. Los humanos son los hospedadores convencionales, aunque recientemente se han reportado casos que informan sobre la expansión de hospedadores a ciertos animales (Zhu, Shi, Zhou, Li, & Zhang, 2018).

Shigella ha desarrollado mecanismos que le permiten subvertir los procesos de las células del hospedador logrando así provocar la infección, escapar de la detección inmune y prevenir la eliminación bacteriana. Además de ello, un aumento constante en el número de casos de shigelosis causados por ciertas cepas de *Shigella* resistentes a los antibióticos se han convertido en una preocupación creciente (Schnupf & Sansonetti, 2019).

La *Shigella* es un género de especies bacterianas, considerado uno de los cuatro principales patógenos causantes de diarrea moderada a severa. Se agrupa en cuatro especies que incluyen a *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* (Liu, y otros, 2018).

El método diagnóstico tradicional para *Shigella* es cultivo, esta prueba tiene una sensibilidad limitada y depende de la calidad de la muestra, de la carga bacteriana, el tipo de cultivo, el tiempo de recolección después del inicio de la diarrea, el tiempo de cultivo después de la recolección de muestra y el uso de antibióticos por parte del paciente. Mientras que, las pruebas moleculares como PCR cuantitativa, permiten un diagnóstico más acertado (Liu, y otros, 2018).

La patogenicidad de estas especies bacterianas se basa en la expresión de diversos genes de virulencia que están asociados con la colonización, la invasión / penetración y la enfermedad mediada por toxinas. La patogenicidad de estas bacterias virulentas es a menudo multifactorial, y están regulados de forma coordinada (Zhu, Shi, Zhou, Li, & Zhang, 2018).

Las especies del género *Shigella* causan infecciones gastrointestinales agudas, en ciertas ocasiones existen también manifestaciones extraintestinales. El género *Shigella* es altamente infeccioso debido a su baja dosis infecciosa (10-100 organismos). Las infecciones causadas por *Shigella* representan un riesgo importante para la salud pública mundial, en especial en países en desarrollo. El ser humano es el único huésped natural de *Shigella*, la transmisión se da por medio de la ruta fecal-oral (Muthuirulandi Sethuvel, Devanga Ragupathi, Anandan, & Veeraraghavan, 2017). La shigelosis puede transmitirse por la ingestión de alimentos y agua contaminados (Schnupf & Sansonetti, 2019).

Shigella puede causar también infecciones del torrente sanguíneo, síndrome urémico hemolítico, artritis reactiva y puede dar lugar a complicaciones neurológicas (Muthuirulandi Sethuvel, Devanga Ragupathi, Anandan, & Veeraraghavan, 2017).

2.3.6. Klebsiella

Klebsiella es un grupo de especies bacterianas, son bacilos gramnegativos, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (Garza-Ramos, y otros, 2018), no móviles, generalmente son en forma de bastón, encapsuladas, producen lisina descarboxilasa y son positivas a la prueba Voges-Poskauer. La mayoría de las especies del género *Klebsiella* pueden ser identificadas mediante pruebas estándar microbiológicas de laboratorio (Podschun & Ullmann, 1998).

Las especies que forman parte del género *Klebsiella* son *K. pneumoniae*, *K. variicola*, *K. quasipneumoniae*, *K. quasivariicola*. Se caracterizan por ser comúnmente resistentes a diferentes antibióticos. Albergan genes de cefalosporinasa o carbapenemasas, lo cual les confiere resistencia antimicrobiana a los B-lactámicos (Garza-Ramos, y otros, 2018). Otras especies de este género son *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. ornithicolytica* (Podschun & Ullmann, 1998) y *K. mobilis*, *K. rhinoscleromatis* y *K. ozaenae*, estas dos últimas actualmente se consideran subespecies de *K. pneumoniae* (Caputo, y otros, 2015).

Klebsiella es un género bacteriano presente en toda la naturaleza. Tienen un hábitat común al de otros géneros bacterianos como *Enterobacter* y *Citrobacter*. Es decir, las especies de *Klebsiella* habitan en el medio ambiente, en lugares como aguas superficiales, aguas residuales, en tierra y en las plantas, se encuentran también en las superficies mucosas de mamíferos como los humanos, caballos o cerdos. Son bacterias transitorias de la piel humana (Podschun & Ullmann, 1998).

Las especies del género *Klebsiella* son patógenos de importancia debido a que causan diversos síndromes clínicos, tales como infecciones nosocomiales, infecciones del torrente sanguíneo y bacteriemia (Caputo, y otros, 2015).

Especies del género *Klebsiella* son patógenos oportunistas que han sido relacionados como agentes causales de mastitis clínica ambiental. Esta patología es clínicamente relevante debido a que perjudica a las vacas infectadas y resulta también en grandes pérdidas económicas para la industria (Massé, Dufour, & Archambault, 2020).

2.3.7. Yersinia

El género *Yersinia* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, se compone por 19 especies (Savin, y otros, 2019). Las especies de *Yersinia* son cocobacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, considerados patógenos no ambientales (Leon-Velarde, Jun, & Skurnik, 2019).

El género *Yersinia* incluye varias especies bacterianas que se diferencian ampliamente entre sí por el potencial patogénico y por la importancia que representan para la salud pública (Savin, y otros, 2019). Existen tres especies patógenas humanas, son *Yersinia pestis*, microorganismo causal de la peste bubónica y neumónica, mientras que los enteropatógenos *Yersinia enterocolítica* e *Yersinia pseudotuberculosis* ocasionan varias patologías intestinales (Knittel, Vollmer, Volk, & Dersch, 2018).

Estas dos últimas especies son los principales agentes causales de diarrea de origen bacteriano en países de clima frío y templado (Savin, y otros, 2019). El potencial patogénico del género *Yersinia* es heterogéneo, por ello es vital la identificación a nivel de especies, para el seguimiento de pacientes con el fin de guiar e identificar las medidas necesarias de salud pública (Savin, y otros, 2019).

La identificación completa de un miembro de *Yersinia* se realiza en laboratorios referencias, utilizando pruebas fenotípicas tales como la capacidad de crecer en fuentes de carbono específicas, seroaglutinación, pruebas enzimáticas y motilidad (Savin, y otros, 2019).

Las especies patógenas del género *Yersinia*, es decir *Y. pestis*, *Y. enterocolítica* y *Y. pseudotuberculosis*, han sido empleadas como modelos bacterianos para el estudio e investigación de la evolución en la patogénesis dado por las bacterias en los mamíferos (McNally, Thomson, Reuter, & Wren, 2016).

Yersinia enterocolítica, especie patógena para humanos y animales, es un agente zoonótico transmitido por alimentos, que ocasiona infecciones entéricas, linfadenitis mesentérica y en ocasiones, deja secuelas como la artritis reactiva y el eritema nudoso. La fuente más común es la carne de cerdo cruda. *Y. enterocolítica* prolifera a 4°C, debido a esto es peligroso cuando los alimentos contaminados son almacenados bajo refrigeración (Leon-Velarde, Jun, & Skurnik, 2019).

2.3.8. Enterobacter

Enterobacter es un género de especies bacterianas gram negativas, causantes de infecciones sépticas por medio de expresión de diferentes factores de virulencia y aptitud física como pili, flagelos, proteínas de membrana externa, cápsulas, exotoxinas y endotoxinas y son capaces de superar el estrés oxidativo (Pati, y otros, 2018).

Las especies de *Enterobacter* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. *Enterobacter* es el segundo género bacteriano más prevalente productor de carbapenemasas, propiedad que le otorga resistencia a carbapenem. Son agentes causales de infecciones nosocomiales clínicamente significativas (Chavda, y otros, 2016). Son especies ubicuas, tienen buena adaptación al medio ambiente, pueden sobrevivir en la piel y superficies secas, su replicación puede ocurrir en fluidos contaminados (Pati, y otros, 2018).

El género *Enterobacter* pertenece al grupo ESKAPE, este grupo contiene a los principales agentes bacterianos resistentes a los antimicrobianos. El género *Enterobacter* ha evolucionado exponencialmente tanto a nivel fenotípico como genotípico. Actualmente, se conocen 22 especies del género *Enterobacter*. Estas especies habitan en el medio ambiente y son reconocidas como patógenos

oportunistas en plantas, animales y en el ser humano (Davin-Regli, Lavigne, & Pagès, 2019). Han ocurrido varios brotes causados por *Enterobacter*, principalmente transmitidos por alimentos contaminados (Pati, y otros, 2018).

Se han realizado múltiples investigaciones acerca de la resistencia a los antibióticos que poseen las especies de *Enterobacter*. Estas especies son capaces de manejar distintos mecanismos de resistencia por medio de algunos genes reguladores locales y globales y por la modulación de la expresión de diferentes proteínas, entre estas las enzimas como B-lactamasa, o transportadores de membrana, como las porinas y bombas de flujo (Davin-Regli, Lavigne, & Pagès, 2019).

Las enterobacterias pueden ocasionar cuadros de bacteriemias, infecciones del tracto respiratorio inferior, de la piel y tejidos blandos, del tracto urinario (ITU), intraabdominales u oftálmicas, otras patologías que pueden ocurrir son endocarditis, artritis séptica u osteomielitis (Pati, y otros, 2018).

2.3.8.1. Escherichia coli

Escherichia coli (*E. coli*) es una especie bacteriana, pertenece a la familia de Enterobacteriaceae, tiene una estrecha relación filogenética con *Shigella*, *Citrobacter* y *Salmonella* (Kneifel & Forsythe, 2017), es anaerobia facultativa (Gordo, Demengeot, & Xavier, 2014). *E. coli* es residente natural del tracto gastrointestinal de mamíferos, colonizando aproximadamente 10^8 organismos por gramo de heces en adultos sanos, la colonización es mucho más alta durante respuestas inflamatorias (Figler & Dudley, 2016). Es una de las bacterias más estudiadas y con mayor número de facetas. Alberga el intestino de seres humanos, de animales de sangre caliente y también habita en el medio ambiente (Kneifel & Forsythe, 2017).

E. coli fue descubierta en 1884 por Theodor Escherich, pediatra especializado en la salud infantil, tras la observación de colonización dada de forma rápida en el sistema digestivo de bebés de un día de nacidos. En 1919, Sir Castellani cambia el nombre que se había dado a esta especie bacteriana, *Bacterium coli*,

para ser nombrada como es conocida actualmente, *Escherichia Coli*, honorando las contribuciones de Theodor Escherich (Stürchler, 2019).

Escherichia coli es la especie comensal prototípica de la microflora colónica anaeróbica facultativa (Kaper, 2005), es decir es una parte natural de la microbiota del hombre y otros animales, se aloja en el colon como parte de la flora comensal que vive en relación simbiótica con el huésped (Olesen, 2017). Debido a esta característica, se han realizado investigaciones de manera constante, con el fin de reconocer a esta especie como un tratamiento probiótico para algunas patologías, tales como una diarrea infecciosa o una colitis ulcerosa. *E. coli* es una especie que ha tenido un papel de gran importancia en el desarrollo del campo de biología molecular, ya que ha sido un microorganismo modelo temprano para aclarar aspectos fundamentales acerca de la regulación génica (Kaper, 2005). Esta especie bacteriana ha jugado un rol importante para la producción industrial de proteínas recombinantes y ADN plasmídico con fines terapéuticos (Castiñeiras, Williams, Hitchcock, & Smith, 2014). Hasta el momento no existe otra bacteria como *E. coli* que haya permitido tantos avances en la medicina, biología y biotecnología (Kneifel & Forsythe, 2017).

E. coli es una especie bacteriana capaz de adaptarse con facilidad a nuevos ambientes y variables. Su diversidad es tanto genética como fenotípica, incluso puede llegar a ser un patógeno mortal (Gordo, Demengeot, & Xavier, 2014). *E. coli* tiene una gran diversidad de categorías, mismas que van desde probióticas beneficiosas como *E. coli* Nissle 1917 hasta variedades enteropatógenas como *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* verotoxigénica (VTEC), sinónimos de la toxina Shiga de *E. coli*, la cual forma parte de la categoría de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), otra variedad de igual importancia es *E. coli* enteroagregativa (EaggEC). Estas variedades son causantes de trastornos gastrointestinales, diarrea e incluso complicaciones septicémicas graves (Kneifel & Forsythe, 2017). La cepa probiótica *E. coli* Nissle 1917 puede tener propiedades antiinflamatorias. Por otro lado, *E. coli* enteroagregativa puede ser devastadoramente virulenta, como ocurrió con el brote de O104:H4, en el cual 3000 pacientes fueron afectados por esta cepa y más de 800 desarrollaron

síndrome urémico hemolítico. La diferencia entre cepas está dada por la flexibilidad del genoma, *E. coli* transporta entre 4.5 y 5.5 Mbp de ADN, menos de la mitad de los genes codificados se conservan entre los miembros de esta especie (Figler & Dudley, 2016).

E. coli es una bacteria muy cambiante, con un espectro que va desde la flora comensal hasta ser la causa de infecciones urinarias e intestinales y sepsis (Stürchler, 2019). *E. coli* es el agente bacteriano más común de infección de tracto urinario y bacteriemia gramnegativa (Olesen, 2017). En el intestino, *E. coli* puede liberar elementos móviles, como plásmidos y bacteriófagos, que transmiten factores de virulencia como B-lactamasas, mismas que son medianamente resistentes a los B-lactámicos (Stürchler, 2019).

E. coli puede sobrevivir a un pH bajo y posee varios sistemas genéticos diferentes que le confieren esta propiedad. Estos sistemas pueden expresarse de forma estacionaria o pueden estar inducidos por crecimiento en varias condiciones. Las actividades de los sistemas genéticos le han otorgado a *E. coli* la capacidad de atravesar la barrera ácida del estómago logrando de este modo llegar al tracto gastrointestinal, causando infecciones graves (De Biase & Lund, 2015).

E. coli puede clasificarse en distintos serogrupos acorde a los anticuerpos unidos a diferentes lipopolisacáridos expuestos en la superficie (antígeno O), por distintos tipos flagelares expresados (tipo H) y si se presenta el antígeno de superficie K (tipo K). Los tres tipos H, O y K en conjunto son denominados serotipos (Figler & Dudley, 2016).

E. coli O157:H7 es un serotipo responsable de varios brotes transmitidos por alimentos en todo el mundo. Las cepas de *E. coli* O157:H7 son diferentes por su capacidad de virulencia, de otras cepas que pocas veces causan los mismos síntomas. Debido a esto, *E. coli* O157:H7 es un microorganismo modelo para el estudio de cómo las bacterias y los factores del huésped afectan los resultados de la patología. Este subtipo expresa dos rasgos característicos de virulencia, el uno permite la adición a los intestinos y la modulación inmune, mientras que el

otro, que es la toxina Shiga, inhibe la síntesis de proteínas y causa daño celular a nivel del endotelio capilar y en los riñones (Figler & Dudley, 2016).

E. coli es un indicador fecal en la higiene del agua, alimentos, piensos, debido a que su presencia está relacionada directa o indirectamente con la contaminación fecal. Debido a esto, de encontrarse en tales productos representa una advertencia sobre las deficiencias en la limpieza e higiene (Kneifel & Forsythe, 2017).

Escherichia coli representa un agente causal de morbilidad y mortalidad importante en todo el mundo. El tratamiento de las patologías causadas por *E. coli* representa una amenaza debido a la resistencia a los antibióticos. Esta resistencia se ha diseminado debido a los elementos genéticos móviles, tales como los plásmidos, los cuales pueden llevar consigo los factores de virulencia. Un agente patógeno competente se caracteriza por ser virulento y resistente a los antimicrobianos. Existe la posibilidad de que las cepas menos virulentas de *E. coli* tengan mayor predisposición para adquirir resistencia a los antibióticos como las quinolonas (Da Silva & Mendonça, 2012).

2.4. Aislamiento bacteriano

Es necesario condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano y es eso consiste un cultivo, en proporcionar condiciones químicas, nutricionales y físicas, en un ambiente simulado, se utilizan medios de crecimiento con características selectivas o diferenciales orientadas hacia la familia y tipo de bacteria que se desea cultivar y aislar, en la mayoría de los casos los aislamientos bacterianos de laboratorio se realizan mediante la producción de colonias en medios sólidos, semi sólidos o líquidos y la consistencia del medio depende de la cantidad del polisacárido Agar que se le adicione y se mide en porcentajes; para medios solidos se adiciona del 1.5% al 2%, para semisólidos se adicional el 0.5% y para medios líquidos no se agrega Agar (Washington C. Winn, 2008).

La composición de los medios varía, algunos pueden contener líquido ascítico, antibióticos, glicerina, sangre, colorantes, sales biliares, etc. Lo que los vuelve

enriquecido, selectivo o diferencial con el objetivo de obtener mayor información en el crecimiento artificial. (Koneman, 2008).

Con la finalidad de obtener colonias separadas, la siembra se realiza con diferentes técnicas, como son estrías por el método común (deslizamiento del aza en zigzag en la caja Petri) o por el método francés (deslizamiento del aza para hacer líneas paralelas y perpendiculares) (Radamés L, 2013).

2.4.1. Agar MacConkey

Considerado un agar diferencial y selectivo, entre sus características principales se puede notar que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas, ya que contiene cristal violeta y sales biliares las cuales se usan específicamente para inhibir gram positivas. Es un gar selectivo y que evidencia la diferencia entre coliformes y no fermentadoras de lactosa como *E. coli*, *Klebsiella* o *Enterobacter*, estas crecen formando un halo rojo o violeta a un alrededor mientras que bacterias como *Proteus* o *Shigella* crecen formando un halo transparente a su alrededor lo que indica que no fermentan lactosa. Permite el crecimiento efectivo de bacterias Gram positivas por su contenido que consiste en una mezcla de agua destilada con un pH de 7.1, polipeptona, lactosa, peptona, rojo neutro, cloruro de sodio y agar, estos son requerimientos para una multiplicación bacteriana óptima (Britania lab, 2001).

2.4.2. Agar Nutritivo

En un agar nutritivo se agregan factores específicos para el crecimiento bacteriano en general, usados generalmente para las primeras siembras, permite obtener colonias de diferentes especies bacterianas (Radamés L, 2013)

El agua es fundamental para solubilizar los nutrientes, transportarlos y asegurar las reacciones de hidrólisis mientras que el carbono es el elemento constituyente más abundante en las bacterias. Es vital que las bacterias produzcan moléculas de carbono tales como grasas, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. El dióxido de carbono puede ser una fuente inorgánica de carbono, mientras que

los azúcares y alcoholes pueden ser fuentes orgánicas de carbono para las bacterias (Bonnet, Lagier, Raoult, & Khelaifia, 2019).

En el agar nutritivo (generalmente contiene peptona, extracto de levadura, 1.5% de agar, extracto de carne, agua destilada, cloruro de sodio), el extracto de carne es la fuente de carbohidratos, nitrógeno y vitaminas de las bacterias (PROBIOTEK, 2017)

Las bacterias fototróficas utilizan la luz como fuente de energía transformando la luz en un gradiente electroquímico de protones, mientras que las bacterias quimiotróficas utilizan como fuente de energía a los compuestos orgánicos o a la oxidación de minerales (Bonnet, Lagier, Raoult, & Khelaifia, 2019).

2.4.3. Agar Manitol

En ciertas ocasiones es necesario utilizar un medio de cultivo selectivo con el fin de aislar una especie o género bacteriano particular. Una vez se han adicionado varios inhibidores al medio de cultivo, el objetivo de un medio selectivo es eliminar la flora microbiana no deseada (Bonnet, Lagier, Raoult, & Khelaifia, 2019).

Las sales de sodio se conocen por las propiedades inhibitorias que posee. De estas sales, el más conocido es el cloruro de sodio, el cual se emplea para seleccionar bacterias halófilas que resisten cantidades muy altas de sales. El agar de sal de manitol es un ejemplo de cultivo de cloruro de sodio.

El agar de sal de manitol puede ser empleado para el cultivo de microorganismos gram positivos y gram negativos con la excepción de bacterias halofílicas y halotolerantes en ambos casos. El agar de sal de manitol no permite el cultivo de hongos y levaduras (Bonnet, Lagier, Raoult, & Khelaifia, 2019).

El agar con sal de manitol es un medio que usualmente es empleado en medicina humana para lograr diferenciar *Staphylococcus aureus* de estafilococos coagulasa negativos (De Visscher, y otros, 2013).

El agar manitol ha sido empleado como herramienta para el diagnóstico microbiológico de la mastitis bovina. Este agar permite el crecimiento de todos los patógenos importantes de mastitis bacteriana, tales como *estafilococos*, *estreptococos*, *coliformes* y *pseudomonas*. La diferenciación de estafilococos patógenos de no patógenos ocurre por medio del cambio de color alrededor de las colonias (Ayeni, Andersen, & Nørskov-Lauritsen, 2017).

2.4.4. Prueba Voges Proskauer

Voges y Proskauer en el año de 1989, observaron por primera vez esta reacción cuando realizaban sus estudios sobre “Las bacterias de la septicemia hemorrágica” (Levine, 2004), fue cuando describieron la formación de una coloración similar a eosina en cultivos de glucosa peptona de ciertos organismos a los cuales se les había añadido solución de hidróxido de potasio al 10%. Esta reacción se denomina prueba Voges Proskauer y es de utilidad para la identificación y diferenciación de microorganismos. La reacción de Voges Proskauer depende de la producción de acetoína (acetil metil carbinol), la cual se trata de una sustancia reducida no volátil. El acetil metil carbinol es oxidado una vez que se añade el hidróxido de potasio y en presencia de peptona se da lugar a la coloración parecida a la eosina (Werkman, 2001).

La coloración similar a eosina de la prueba Voges Proskauer puede observarse posterior a una hora o más, en ciertos microorganismos esta coloración es débil e indistinta, lo cual provoca muchas veces que la lectura arroje resultados inciertos y poco confiables, en especial sobre medios coloreados. La prueba Voges Proskauer debe ser aplicada a un medio de glucosa (Werkman, 2001).

La capacidad de producir acetoína en un medio de glucosa, como ocurre en la reacción de Voges Proskauer, es una característica taxonómica de gran utilidad ya que permite diferenciar miembros bacterianos de la familia Enterobacteriaceae (Barry & Feeney, 2003). Esta prueba permite diferenciar cepas de *Escherichia coli* de *Klebsiella* y *Enterobacter* (Gil, 2020).

Al utilizar pruebas altamente específicas, pueden ocurrir reacciones positivas con microorganismos que son considerados negativos con la prueba de Voges Proskauer. Así también, puede ocurrir que algunos microorganismos que normalmente se consideran positivos a la prueba de Voges Proskauer pueden fallar a la hora de producir suficiente acetoina para ser detectada con otros métodos que no sean tan sensibles (Barry & Feeney, 2003).

2.4.5. Prueba Rojo de Metilo

Los métodos estándar empleados para la prueba rojo de metilo no son prácticos para ser usados rutinariamente en laboratorios clínicos ya que el período necesario para la incubación es prolongado. En caso de que se lean los resultados obtenidos tras un tiempo transcurrido desde la incubación, la prueba podría arrojar falsos positivos (Barry, Bernsohn, Adams, & Thrupp, 2002).

Los factores más importantes para el rendimiento de la prueba rojo de metilo son la temperatura y el tiempo de incubación de la bacteria. Diferentes especies de bacterias coliformes producen diferentes reacciones de rojo de metilo en distintas temperaturas y períodos de incubación. Es recomendable que la incubación del cultivo de fosfato de dextrosa sea a 27°C, debido a que a esta temperatura el período de incubación puede darse en tres días en lugar de cinco días, como ocurre cuando la temperatura es de 30°C (Ljutov, 2009).

La elección de la calidad de la peptona tiene un efecto significativo en la reacción de rojo de metilo. Mientras que, el contenido de amoníaco es un factor sin importancia relevante en la prueba rojo de metilo (Ljutov, 2009).

El fundamento de la prueba rojo de metilo se basa en que la bacteria puede fermentar la glucosa por la vía ácida mixta, produciendo metabolitos tales como ácido láctico, fórmico y succínico, mismos que provocan el descenso del pH inicial, esto puede observarse una vez que se agregue el indicador pH rojo de metilo, ya que provoca que el pH ácido tome la coloración de rojo (Murcia, 2020).

La prueba rojo de metilo es una prueba bioquímica que en conjunto con las pruebas Indol, Voges Proskauer y Citrato es uno de los métodos utilizados para identificar bacterias de la familia Enterobacteriaceae (Musó & Acosta, 2017).

En caso de que no se deje incubar el tiempo idóneo se podría obtener falsos positivos, ya que los microorganismos rojos de metilo negativos no han contado con el tiempo necesario para llevar a cabo la metabolización de productos ácidos iniciales (Musó & Acosta, 2017).

2.4.6. Prueba de Indol

Las enterobacterias gracias a la triptofanasa son capaces de utilizar el triptófano y producir amoníaco, Indol y ácido pirúvico, en este caso el medio se torna de color rosado por la adición del reactivo de Kovac.

2.5. Detección de antibióticos en leche

2.5.1. Trisensor

Prueba de referencia que revela de manera específica las concentraciones de análogos de antibióticos, prueba fácil de hacer y rápida para la detección de 3 familias de antibióticos, es capaz de detectar simultáneamente la presencia de betalactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas en muestras de leche, se considera un ensayo de flujo lateral que en un primer componente (posillo) emplea anticuerpos monoclonales específicos, así como receptores específicos enlazados con partículas de oro y en su segundo componente (tiras indicadoras) poseen membranas de captura lineal. En esta prueba es primordial que la línea de control sea completamente visible y el resto de las líneas de pruebas específicas se encuentren por debajo de ésta (UNISENSOR, 2016).

En el momento que las tiras son sumergidas, la leche empezará a subir atravesando las ondas de captura, en el caso de que la muestra de leche no contenga antibióticos se revela el color de las líneas de captura específicas, esto nos indica la ausencia de analitos. En el caso de que la muestra de leche si contenga antibióticos, no provocará el revelado del color en las líneas de captura.

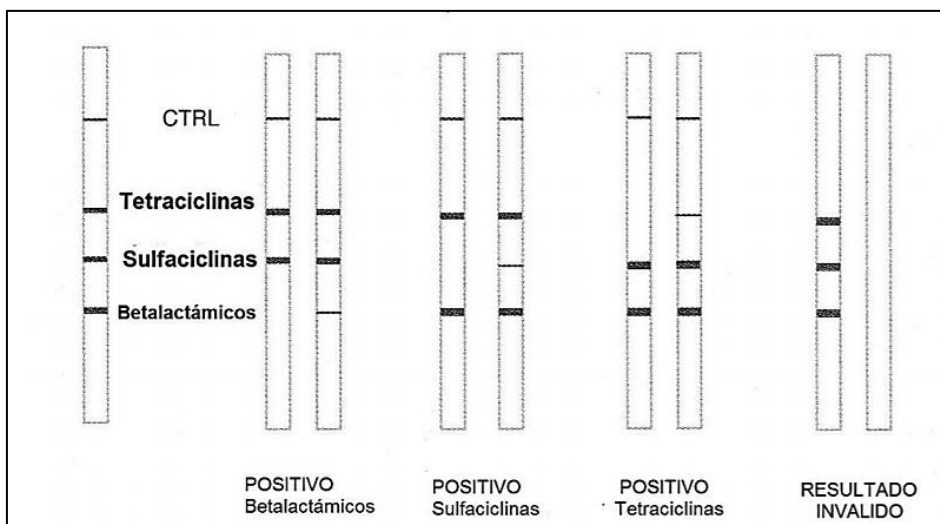


Figura 1. Interpretación de kit analítico de tiras reactivas Trisensor. Tomado de TRISENSOR®, 2020.

2.6. Consumo de leche cruda relacionada con ETA's

El consumo de alimentos crudos se considera uno de los principales problemas a nivel mundial en salud pública y aumenta el riesgo cuando estos alimentos son mal manipulados o de dudosa procedencia, la ausencia de un proceso físico como la pasteurización en el caso de la leche puede dar paso a la presencia de una gran variedad de microorganismos considerados mayormente como patógenos, al ser ingeridos se puede presentar cuadros gastroentéricos con diferentes síntomas como dolor generalizado del cuerpo, dolor abdominal, cuadros febriles, diarreas, náuseas, dolor de cabeza, vómitos, y especialmente afecta a la población vulnerable como son ancianos, bebés, niños y mujeres embarazadas (U.S Department of Health and Human Services, 2015).

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

Esta investigación de campo de recolección de muestras se realizó en varios puntos de expendio y comercialización de leche cruda de burra en el sur del Distrito Metropolitano de Quito (***Figura 2***), dispuestos en la siguiente tabla de sectores de sur a norte:

Tabla 1.

Sectores y su dirección para el desarrollo de la investigación.

Sector	Dirección
“La Santiago”	Av. Mariscal Sucre y Alonso Angulo
“El pintado”	Av. Mariscal e Illescas
“Chilibulo”	Av. Mariscal y Chilibulo
“La Magdalena”	Av. Mariscal y Puruhá
“La Mascota”	Av. Mariscal y los Libertadores.

El sur del Distrito Metropolitano de Quito tiene una altura que va desde los 2200 a 3100 msnm, con precipitaciones de 1272 (mm/año) y una temperatura que varía entre los 13.9°C a 22°C.



Figura 2. Sectorización. Localización de sectores para recolección de muestras de leche cruda de burra en el sur de Quito marcado con números. Tomado de Google Maps, 2020.

3.2. Población y muestra

El grupo de análisis en el estudio fueron 20 individuos *Equus asinus* (burras) que se encontraban en fase de producción de leche en el período del 30 de Julio al 3 de agosto del 2019, las cuales son ordeñadas en distintos sectores en el sur de Quito, en la modalidad de venta informal de leche cruda de burra.

Con la finalidad de obtener 40 muestras en total, se realizó la recolección en dos etapas, en las cuales se recolectó 20 muestras en cada una, con un intervalo de tres días entre cada etapa, las muestras fueron etiquetadas al cabo de su colecta para su posterior entrega al Laboratorio de Diagnóstico LIVEXLAB® de la ciudad de Quito.

Tabla 2.

Asignación de códigos en base a la localización y animal muestreado

Número de sector	Sector	Color del sector	Número de animales¹	Código de muestras²
1	“La Santiago”	Rojo	1,2,3,4,5	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5
2	“El Pintado”	Naranja	1,2,3	1.1, 1.2, 1.3
3	“Chilibulo”	Amarillo	1,2,3,4	1.2, 1.3, 1.4, 1.5
4	“La Magdalena”	Morado	1,2,3	1.1, 1.2, 1.3
5	“La Mascota”	Verde	1,2,3,4,5	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5

1. *Número de animales: cada número corresponde a un animal*

2. *Código de muestra: corresponde a la unión del código del sector con el número de animal en orden ascendente.*

3.2.1 Variables de estudio

Variables	Tipo de variable	Definición	Indicador	Unidad de medida	Ítem	Instrumento
Rastros de antibióticos	Cualitativa dicotómica independiente	Cantidad de antibióticos en la leche acorde a lo utilizado en el animal	Betalactámicos Sulfonamidas Tetraciclinas	Si/no	Si/no	Medición directa
Bacterias	Cuantitativa Continua dependiente	Cantidad de unidades formadoras de colonias	UFC.	UFC/ml	N° de UFC	Medición directa
Animales	Cuantitativa discreta dependientes	Cantidad de burras en producción de leche	Burras	ene-20	Si/no	Medición directa

3.3. Materiales

3.3.1. De campo

- Caja de guantes de látex talla número 7.
- Envases plásticos estériles de 125ml.

- Cámara fotográfica.
- Cooler portátil.
- Cuaderno de anotaciones.
- Bolsas de hielo en gel.
- Esferográfico *BIC* punta fina.
- Marcador permanente

3.3.2. De laboratorio

- Cámara de flujo.
- Heatsenser (Incubadora a 40°C).
- Micropipeta.
- Microscopio.
- Muestras de leche.
- Pinza anatómica de metal.
- Pipeta automática.
- Placas 3M™ Petrifilm™ para recuento de Enterobacterias.
- Puntas desechables 0.2 ml.
- Puntas desechables 1ml.
- Refrigerador para muestra
- Agar Maltosa
- Agar DNAsa
- Agua destilada
- Agar Manitol
- Alcohol
- Bolsas de gel hielo
- Cámara fotográfica
- Cuaderno
- Esfero
- Cofia
- Mandil
- Dispensor

- Gel antibacterial
- Guantes de látex
- Jabón antibacterial
- Kit trisensor
- Mascarilla
- Marcador permanente
- Mesa de trabajo

3.2.3 De oficina

- Computador
- Escritorio
- Silla
- Software (SPSS)

3.4. Metodología

El estudio es de tipo, Observacional, longitudinal y prospectivo en donde se identificó la presencia o ausencia de antibióticos, mediante tiras reactivas y E.Coli mediante agares específicos, en la leche cruda de burra expedida en ciertas zonas del Sur de Quito sin modificar las variables ni la forma como se expende la leche, tomando en cuenta que la investigación comprende un período de tiempo delimitado el cual no superó los 3 meses calendario, periodo en el que las muestras de leche cruda de burra fueron recolectadas y analizados sin modificar el manejo de los animales ni su ambiente Aquellas muestras positivas a E.coli y antibióticos serían consideradas para determinar multiresistencia y de esta manera determinar si existe relación con afecciones a la salud por ETA's. El muestreo de leche se realizó en distintas fechas de los mismos individuos con un lapso de tiempo de tres días, no se modifican variables y los resultados esperados es a partir del análisis de las muestras.

Con la finalidad de obtener muestras de leche cruda de burra se empleó una metodología específica a nivel de campo (***Figura 3***) para la ejecución de la investigación.

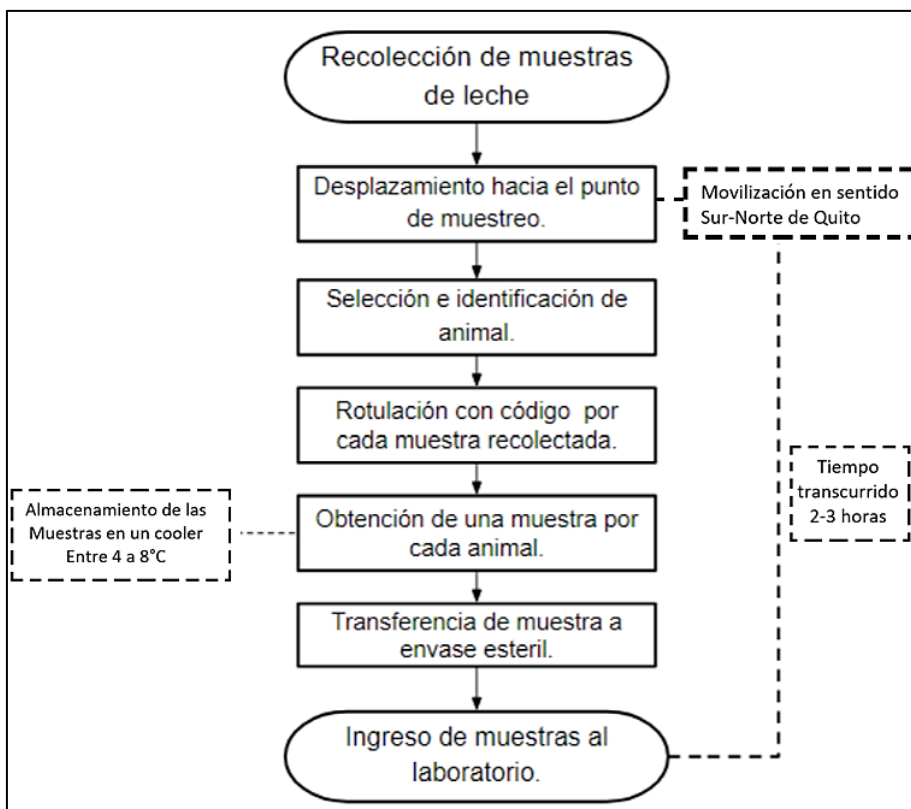


Figura 3. Diagrama de recolección de muestras de laboratorio.

3.4.1. Toma de muestras

El método de muestreo que se empleó fue el recomendado por el Laboratorio LIVEXLAB®, en su documento digital el “Manual de Procedimiento para la Toma y Envío de muestras al laboratorio”, sin embargo, en la toma de muestras se omitió la desinfección y lavado de pezones debido a que no se cumple este parámetro por parte de los comerciantes informales.

La fase de recolección se dio entre las fechas del 30 de julio al 3 de agosto de 2019, en este punto se definió que la recolección sería a tempranas horas de la mañana como fueron de 6:30 am a 7:30 am. El mapa de distribución definido en la figura 2 se lo clasificó en 5 sectores (tabla 1) para disminuir el tiempo por cada punto de recolección y mantener la cadena de frío lo mejor posible para su correcto procesamiento.

Un elemento por considerarse en la compra de leche cruda de burra, es transferir la leche del recipiente original de plástico en la que se comercializa hacia frascos estériles de 125ml (20-40 ml leche cruda) y evitando contaminación cruzada del ambiente o por una indebida manipulación de la tapa y sus bordes para ello se debe utilizar guante de látex en todo el proceso hasta la culminación del rotulado y sellado del envase.

En cada envase de leche debe estar presente el código por cada sector y animal, los cuales fueron asignados en la Tabla 1, y fueron depositados en el cooler con bolsas de gel en temperaturas entre 2-8°C.

3.4.2. Método analítico Trisensor para la detección de antibiótico en leche cruda por tiras reactivas

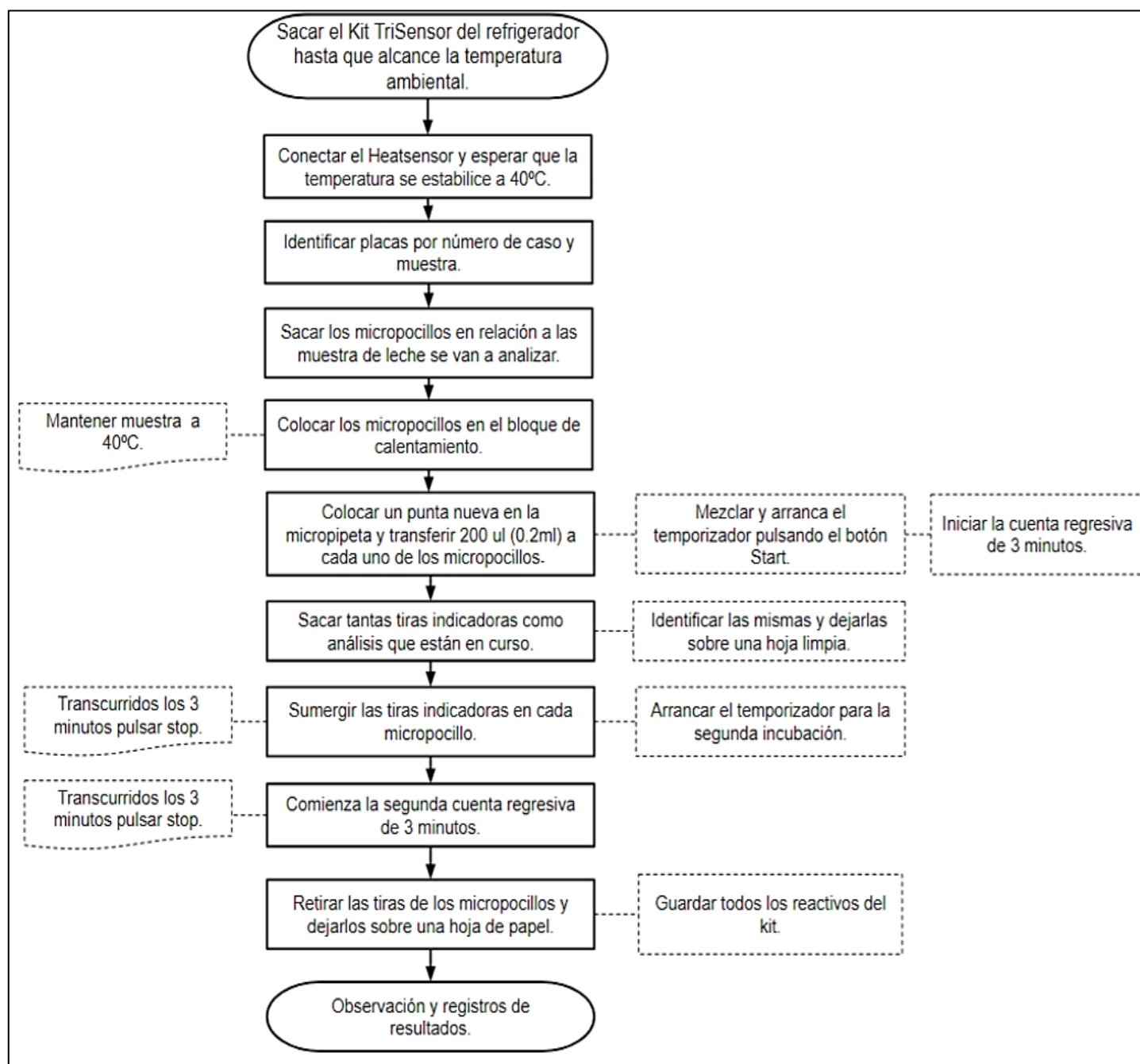


Figura 4. Diagrama de metodología para la detección de antibióticos en leche por Trisensor tiras reactivas. Tomado de TRISENSOR ©, 2020.

3.4.3. Método analítico para recuento de *E. coli* mediante Petrifilm en leche cruda

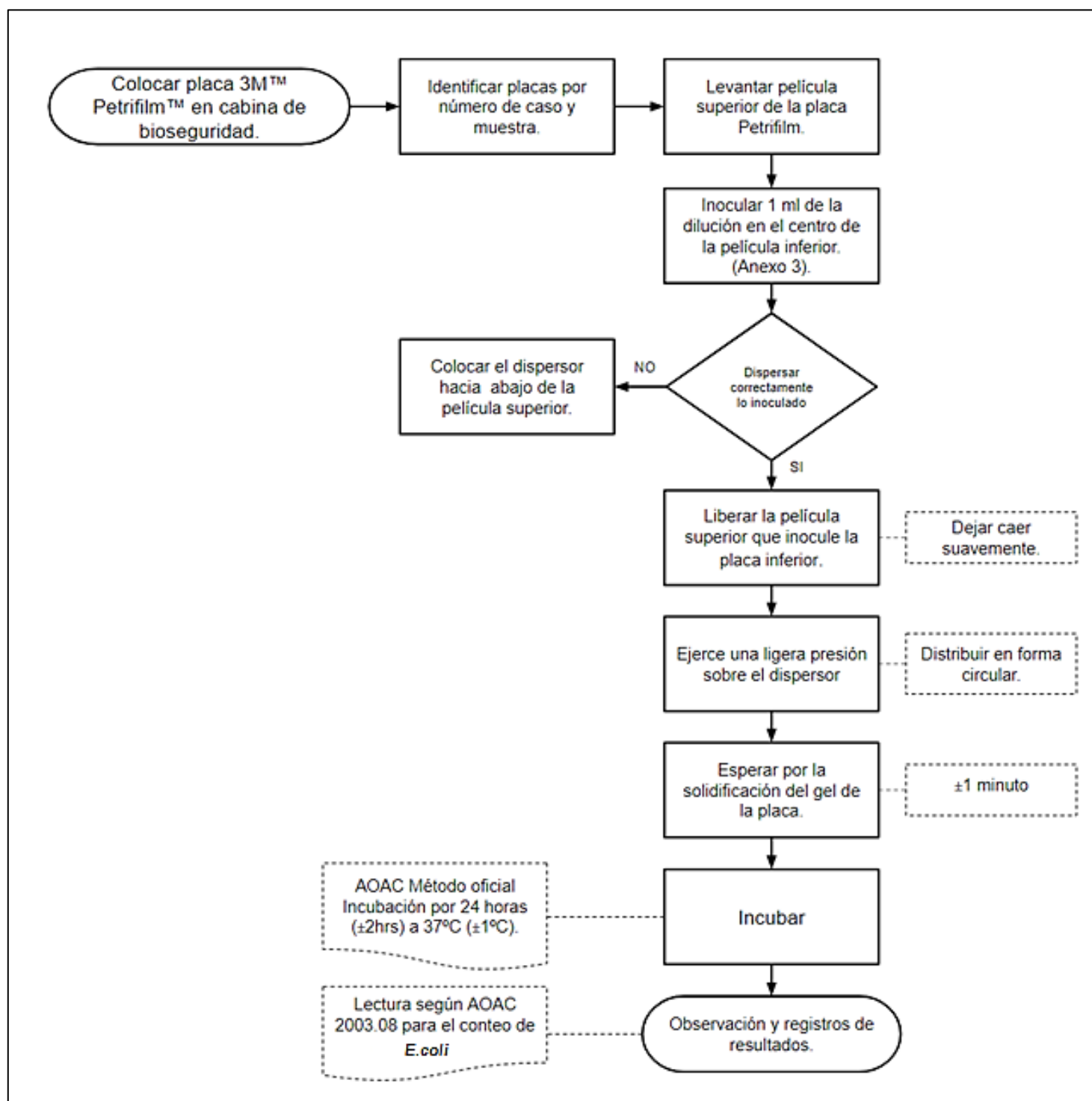


Figura 5. Diagrama de análisis de placas 3M™ Petrifilm™ para análisis. Tomado de 3M™ Petrifilm™, 2020.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

Los resultados obtenidos en la investigación 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®) presentaron un resultado negativo para la totalidad de las muestras y en cultivos 3M™ Petrifilm™ de *Escherichia coli* también presentaron resultados negativos en su totalidad.

4.1.1. Identificación de antibióticos en leche

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.

4.1.2. Identificación Bacteriana

Los resultados obtenidos correspondientes al análisis de 40 muestras de leche cruda de burra concluyeron que el 100% de las muestras no presentó crecimiento bacteriano en placas 3M™ Petrifilm™ para *Escherichia coli*.

4.1.3. Antibiograma

No se realizaron antibiogramas al tener como resultado ningún crecimiento bacteriano en placas 3M™ Petrifilm™ de enterobacterias.

4.2. Discusión

En el presente estudio los resultados fueron negativos a la presencia de Betalactámicos, Tetraciclinas y Sulfonamidas mediante la técnica de tiras reactivas (TriSensor®) y pueden atribuirse a la baja prevalencia de afecciones patológicas en burras como lo dice Ragona y colaboradores (2016) en su estudio “Cadena de burro de Amiata: evaluación de la salud animal y calidad de la leche”

realizaron ensayos bacteriológicos con el objetivo de hallar agentes causantes de trastornos bacterianos reproductivos, los cuales determinaron una prevalencia de 6,44% de *Klebsiella pneumoniae*, sin evidenciar signos clínicos de enfermedades reproductivas. La prevalencia de *Streptococcus equi zooepidemicus* fue de 9,68% y 0% de *Pseudomonas aeruginosa*. Estas tres especies bacterianas representan la flora bacteriana comensal del sistema genital de las burras, las cuales generalmente crecen y proliferan en condiciones de estrés, dicho esto, la prevalencia encontrada no fue evidencia para concluir con el diagnóstico de endometritis, de hecho, las hembras fueron reevaluadas y ninguna dio resultados positivos para las bacterias mencionadas anteriormente. La prevalencia de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas fue 0% de *Brucella spp.*, 0% de *Leptospira spp.* y 0% de *Salmonella abortus equi*. De igual manera ocurrió con otro agente bacteriano reproductivo, *Taylorella equigenitalis*. Finalmente, los autores al evaluar la salud de la ubre de las burras prevalencia del 3,22% de *Staphylococcus aureus* y 6,44% de *Streptococcus equi zooepidemicus*. La anatomía peculiar de la ubre equidistante, bien apoyada y suficientemente elevada en relación al suelo permiten que la prevalencia de agentes causales de mastitis sea tan baja en las burras.

De igual manera lo corrobora Pilla y colaboradores (2010) quien confirma una baja prevalencia de infecciones intramamarias, por lo que concluye que la leche de burra posee un mayor porcentaje de seguridad al consumidor al no aplicar antibióticos. (Pilla, Daprà, Zecconi, & Piccinini, 2010).

Por otro lado en el presente estudio no se detectó presencia ni crecimiento de enterobacterias en leche cruda de burra, esto coincide con lo que dice Colavita y colaboradores en el 2016 quienes han concluido que la contaminación microbiana, así como el recuento de células somáticas son considerablemente bajos en la leche de burra, se ha demostrado también que existe baja presencia de patógenos como *Escherichia coli* O157, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolítica*, *Brucella spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazakii*, *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*, *Rhodococcus*

equi, *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis*, *Clostridium difficile* y *Burkholderia mallei* (Colavita, Amadoro, Rossi, Fantuz, & Salimei, 2016).

De igual manera, Pilla y colaboradores en el 2010 han confirmado baja prevalencia de infecciones intramamarias en las burras y además de ello, la ausencia de patógenos transmitidos por los alimentos, por lo que han concluido que la leche de burra podría ser un alimento seguro, en caso de que la glándula mamaria se encuentre sana, debido a que las hembras hayan sido ordeñadas bajo correctos parámetros higiénicos (Pilla, Daprà, Zecconi, & Piccinini, 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio se pueden atribuir a que la leche de burra según Yvon representa una fuente de factores antimicrobianos naturales interesantes como lisozimas (Yvon, y otros, 2019). La leche de burra tiene un contenido muy alto de esta enzima inhibidora, la lisozima, con niveles reportados de 1.4 g/l o incluso hasta 4g/l (Gross, Ploetz, & Gottschalk, 2019). Se ha probado que la actividad inhibitoria de la lisozima presente en la leche de burra es responsable de disminuir el crecimiento de microorganismos grampositivos (Adduci, y otros, 2019). La lisozima degrada el peptidoglicano en la pared celular bacteriana grampositiva, lo cual conlleva a que los microorganismos mueran rápidamente (Cosentino, y otros, 2016).

Se considera entonces que los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los resultados obtenidos por Cosentino en el 2016 quien ha evaluado la leche de burra para corroborar la actividad antimicrobiana contra *Bacillus megaterium*, *Bacillus mojavensis*, *Clavibacter michiganensis*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Xanthomonas campestris* y *Escherichia coli*, encontrando que la actividad antimicrobiana está dada por la lisozima, aun cuando la leche ha pasado por tratamientos térmicos como la pasteurización y condensación. Para llevar a cabo el papel antimicrobiano es importante que la cantidad y actividad de lisozima no se anulen debido al tratamiento térmico de la leche (Cosentino, y otros, 2016).

4.3. Limitantes

El estudio realizado es el primer acercamiento en el Ecuador hacia la identificación de *E. coli* en leche cruda de burra que se comercializa en las calles del sur de Quito de manera informal, existieron diversos obstáculos y limitaciones los cuales no facilitaron la recolección de información más concreta que aporten a la investigación.

- La información y literatura sobre Equidos y la descripción de la especie se encuentra desactualizada y es muy limitada.
- En el Ecuador no existe un censo actual sobre équidos, por lo que no se encuentra definida la población de burros.
- Al considerarse las burras de baja importancia en producción de leche, no existe una explotación adecuada o formal en el Ecuador, lo que llevó a la dificultad de definir los sectores donde se encontraban los productores informales
- Al ser animales de producción de traspatio y deambulantes, tomó varias semanas en definir y seleccionar la población de muestreo, hasta identificar el número exacto de animales que poseía cada comerciante.
- El número de animales en cada sector varía cada día de cada productor por lo que es una dificultad el catalogar a cada individuo como parte de la población de muestreo, más aún no existe areteo o identificación de los animales.
- La información proporcionada por los productores es muy limitada y en varias ocasiones falsa debido a la desconfianza y hermetismo que guardan los productores por no comprometer su actividad económica y comercial.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Durante el estudio se tomaron muestras en 5 puntos de mayor comercialización de leche cruda de burra en el sur de Quito, y en base a las pruebas realizadas de TriSensor® por tiras reactivas en los dos muestreos simultáneos, se evidenció la ausencia total de betalactámicos, tetraciclinas y estreptomicinas, por lo tanto, se concluye que no representa un riesgo de salud hacia el consumidor con relación a los tres antibióticos examinados.

En el estudio realizado no hubo crecimiento en ninguna de las muestras valoradas mediante el cultivo en placas de 3M™ Petrifilm™ de enterobacterias, lo que se concluye que no se relaciona el consumo de leche cruda de burra con ETAS por enterobacterias.

En el estudio no se pudo realizar las pruebas de resistencia o sensibilidad de antibióticos y esto se debe a que no hubo crecimiento de enterobacterias en ninguna de las muestras recolectadas en el sur de Quito.

5.2. Recomendaciones

Realizar un censo sobre animales productores de leche no bovinos en el sector del sur de Quito.

Realizar un análisis complementario con relación al tipo de bacterias que se pueden encontrar en la leche cruda de burra, como enterobacterias en general u otro tipo de bacterias.

Realizar un estudio sobre las capacidades antimicrobianas de los compuestos de la leche de burra.

REFERENCIAS

- Adduci, F., Elshafie, H. S., Labella, C., Musto, M., Freschi, P., Paolino, R., . . . Cosentino, C. (2019). Abatement of the clostridial load in the teats of lactating cows with lysozyme derived from donkey milk. *Journal of Dairy Science*, 6750-6755.
- Alais, C. (1985). principios de técnicas lecheras. *CIENCIA DE LA LECHE*.
- Algorta, G. y. (2008). *principales grupos de bacilos gram negativos* . Recuperado el 03 de marzo de 2020, de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/gramnegativosnoexigentes.pdf>
- ANMAT Administración Nacional de Medicamentos, A. y. (10 de 2015). *Gobierno de Argentina* . Recuperado el 3 de 2020, de <http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/salmonelosis.pdf>
- Aspri, M., Leni, G., Galaverna, G., & Papademas, P. (2018). Bioactive properties of fermented donkey milk, before and after in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 476-484.
- Ayeni, F. A., Andersen, C., & Nørskov-Lauritsen, N. (2017). Comparison of growth on mannitol salt agar, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, VITEK® 2 with partial sequencing of 16S rRNA gene for identification of coagulase-negative staphylococci. *Microbial Pathogenesis*, 255-259.
- Barry, A. L., & Feeney, K. L. (2003). Two Quick Methods for Voges-Proskauer Test. *Applied Microbiology*.
- Barry, A. L., Bernsohn, K. L., Adams, A. P., & Thrupp, L. D. (2002). Improved 18-hour methyl red test. *Applied microbiology*, 866-870.
- Bonnet, M., Lagier, J., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2019). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect.*, 34-10062.

- Brenner, D. J., Grimont, P. A., Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Ageron, E., & Riddle, C. F. (1993). Classification of citrobacteria by DNA hybridization: Designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* gen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 645-658.
- Britania lab, d. (2001). *Ma conkey agar*. Recuperado el 01 de 04 de 2020, de <http://www.britanialab.com/productos/B23114%20REV%2001-MAC%20CONKEY%20AGAR.pdf>
- Callejos, A. (2017). *breve introducción a la anatomía de la ubre y a la fisiología del ordeño*. Recuperado el 11 de Abril de 2020, de http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordeno-mecanico/Tema_1._Anatomia_y_Fisiologia/breve-introduccion-a-la-anatomia-de-la-ubre-y-a-la-fisiologia-del-ordeno
- Caputo, A., Merhej, V., Georgiades, K., Fournier, P. E., Croce, O., Robert, C., & Raoult, D. (2015). Pan-genomic analysis to redefine species and subspecies based on quantum discontinuous variation: The *Klebsiella* paradigm. *Biology Direct*.
- Castiñeiras, T. S., Williams, S. G., Hitchcock, A. G., & Smith, D. C. (2014). *E. coli* strain engineering for the production of advanced biopharmaceutical products. *Future Microbiology*, 1235-1238.
- CDC. (2004). *Leche cruda*. Recuperado el 14 de Abril de 2020, de Center for disease control and prevention: <https://www.cdc.gov/spanish/especialescdc/lechecruda/index.html>
- Chavda, K. D., Chen, L., Fouts, D. E., Sutton, G., Brinkac, L., Jenkins, S. G., . . . Kreiswirth, B. N. (2016). Comprehensive genome analysis of carbapenemase-producing *Enterobacter* spp.: New insights into phylogeny, population structure, and resistance mechanisms. *mBio*.

- Clements, T., Ndlovu, T., Khan, S., & Khan, W. (2019). Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 589-602.
- Clermont, D., Motreff, L., Passet, V., Fernandez, J. C., Bizet, C., & Brisse, S. (2015). Multilocus sequence analysis of the genus *Citrobacter* and description of *Citrobacter pasteurii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1486-1490.
- Colavita, G., Amadoro, C., Rossi, F., Fantuz, F., & Salimei, E. (2016). Caratteristiche igienico-sanitarie ed identificazione dei rischi microbiologici nel latte di cavalla e di asina. *Veterinaria Italiana*, 21-29.
- Comercio, E. (15 de 04 de 2012). *La leche de cabra se vende sin regulaciones*. Recuperado el 10 de 05 de 2019, de <https://www.elcomercio.com/actualidad/quito/leche-de-cabra-se-vende.html>
- Cosentino, C., Labella, C., Elshafie, H. S., Camele, I., Musto, M., Paolino, R., . . . Freschi, P. (2016). Effects of different heat treatments on lysozyme quantity and antimicrobial activity of jenny milk. *Journal of Dairy Science*, 5173-5179.
- Da Silva, G. J., & Mendonça, N. (2012). Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence*, 18-28.
- Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*.
- De Biase, D., & Lund, P. A. (2015). The *Escherichia coli* Acid Stress Response and Its Significance for Pathogenesis. *Advances in Applied Microbiology*, 49-88.
- De Visscher, A., Haesebrouck, F., Piepers, S., Vanderhaeghen, W., Supré, K., Leroy, F., . . . De Vliegher, S. (2013). Assessment of the suitability of

mannitol salt agar for growing bovine-associated coagulase-negative staphylococci and its use under field conditions. *Research in Veterinary Science*, 347-351.

Figler, H. M., & Dudley, E. G. (2016). The interplay of *Escherichia coli* O157:H7 and commensal *E. coli*: The importance of strain-level identification. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*, 415-417.

Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., Moreno-Domínguez, S., Toribio-Jiménez, J., Jardón-Pineda, D., Cuevas-Peña, J., . . . Román-Román, A. (2018). Phenotypic and molecular characterization of *Klebsiella* spp. isolates causing community-acquired infections. *New Microbes and New Infections*, 17-27.

Gil, M. (2020). *Lifeder.com*. Obtenido de Test Voges-Proskauer: fundamento, preparación y usos: <https://www.lifeder.com/test-voges-proskauer/>

Gordo, I., Demengeot, J., & Xavier, K. (2014). *Escherichia coli* adaptation to the gut environment: A constant fight for survival. *Future Microbiology*, 1235-1238.

Gottschalk, M. G. (2018). Immunochemical detection of mycotoxins in donkey milk. *Mycotoxin Research*.

Grant, M. (2016). *Jubb, kennedy and Palmers pathology of domestic animals* (sexta edición ed.). Ontario, Canadá: Elsevier.

Grimont, P., & Grimont, F. (1978). THE GENUS *SERRATIA*. *Annual Review of Microbiology* , 221-248.

Gross, M., Ploetz, C. P., & Gottschalk, C. (2019). Immunochemical detection of mycotoxins in donkey milk. *Mycotoxin Research*, 83-87.

Hill R, W. G. (2006). *Fisiología animal*. Panamericana S.A.

- Jirillo, F., & Magrone, T. (2014). Anti-inflammatory and Anti-Allergic Properties of Donkey's and Goat's Milk. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 27-37.
- Kaper, J. B. (2005). Pathogenic Escherichia coli. *International Journal of Medical Microbiology*, 355-356.
- Kneifel, W., & Forsythe, S. (2017). Editorial: The many facets of Escherichia coli: from beneficial bug and genetic workhorse to dangerous menace for plant and creature. *FEMS Microbiology Letters*.
- Knittel, V., Vollmer, I., Volk, M., & Dersch, P. (2018). Discovering RNA-Based Regulatory Systems for Yersinia Virulence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 378.
- Koneman, G. W. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. 6°.
- La Hora. (2008). Leche de burra para calmar la tos. *La Hora*.
- Leon-Velarde, C. G., Jun, J. W., & Skurnik, M. (2019). Yersinia phages and food safety. *Viruses*.
- Levine, M. (2004). On the Significance of the Voges-Proskauer Reaction. *Journal of Bacteriology*, 153.
- Liu, H., Zhao, Z., Xue, Y., Ding, K., & Xue, Q. (2018). Fatal cases of Citrobacter freundii septicemia and encephalitis in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 245-248.
- Liu, J., Almeida, M., Kabir, F., Shakoor, S. Q., Zaidi, A., Li, S., . . . Levine, M. (2018). Direct Detection of Shigella in Stool Specimens by Use of a Metagenomic Approach. *Journal of clinical microbiology*.
- Ljutov, V. (2009). Técnica de ensayo de metil rojo. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 369-380.

- Malaver Marval, 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*. Quito: Quito: Universidad de las Américas, 2016.
- Maria de los Dolores Soto del Rio, A. D. (2017). Characterization of bacterial communities of donkey milk by high-throughput sequencing. *International Journal of Food Microbiology*, 67-72.
- Martini, M., Salari, F., Licitra, R., La Motta, C., & Altomonte, I. (2019). Lysozyme activity in donkey milk. *International Dairy Journal*, 98-101.
- Martini, S. A. (2018). Effects of pasteurization and storage condition on donkey milk nutritional and higienical characteristics. *Jpurnal of Dairy research*. Recuperado el 13 de Abril de 2020
- Massé, J., Dufour, S., & Archambault, M. (2020). Characterization of Klebsiella isolates obtained from clinical mastitis cases in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 3392-3400.
- McNally, A., Thomson, N. R., Reuter, S., & Wren, B. W. (2016). 'Add, stir and reduce': Yersinia spp. as model bacteria for pathogen evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 177-190.
- Mohan, S., Agarwal, J., Srivastava, R., & Singh, M. (2014). Observations on Citrobacter species from a tertiary care health center with special reference to multi-drug resistance and presence of CTX-M gene. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 439-441.
- Murcia, M. (2020). *Identificación de enterobacterias*. Obtenido de https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/35238238/1682472836.Bact_identificacion_bioquimica_enterobacterias.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DIDENTIFICACION_DE_ENTERO

BACTERIAS.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential

- Muso, E., & Acosta, C. (2017). "Evaluación de bioaerosoles asociados en el sitio de disposición final de residuos. Ambato, Ecuador.
- Muthuirulandi Sethuvel, D., Devanga Ragupathi, N., Anandan, S., & Veeraraghavan, B. (2017). Update on: Shigella new serogroups/serotypes and their antimicrobial resistance. *Letters in Applied Microbiology*, 8-18.
- Nayak C Madhusudan, C. T. (2017). Composition, Characteristics, Nutritional value and Health Benefits of Donkey Milk-A Review. *Dairy Science*.
- OIE, O. m. (2016). *Brucellosis*. Recuperado el 03 de marzo de 2020, de <https://www.oie.int/doc/ged/D13939.PDF>
- Olesen, B. (2017). Characterization of four Escherichia coli clonal groups. *APMIS*, 1-28.
- Oyeka, M., & Antony, S. (2017). Citrobacter braakii Bacteremia: Case Report and Review of the Literature. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 59-63.
- Pati, N. B., Doijad, S. P., Schultze, T., Mannala, G. K., Yao, Y., Jaiswal, S., . . . Hegemann, J. D. (2018). Enterobacter bugandensis: A novel enterobacterial species associated with severe clinical infection. *Scientific Reports*.
- Pilla, R., Daprà, V., Zecconi, A., & Piccinini, R. (2010). Hygienic and health characteristics of donkey milk during a follow-up study. *Journal of Dairy Research*, 392-397.
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 589-603.

- PROBIOTEK. (2017). Manual de productos biotecnológicos S.A DE C.V. Ciudad de México, México.
- Public Health Agency of Canada, c. (2011). *PATHOGEN SAFETY DATA SHEET - INFECTIOUS SUBSTANCES*. Recuperado el 03 de marzo de 2020, de <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/proteus.html>
- Puerta-García, A. (2014). *generalidades de enterobacterias*. Recuperado el 03 de marzo de 2020, de http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf
- Radamés L, G. A. (2013). *Microbiología veterinaria II*. Managua, Nicaragua : Editorial U. Nacional agraria de la habna Cuba.
- Ragona, G., Corrias, F., Benedetti, M., Paladini, I., Salari, F., Altomonte, I., & Martini, M. (2016). Amiata donkey milk chain: Animal health evaluation and milk quality. *Italian Journal of Food Safety*.
- Sabag-Daigle, A., Wu, J., Borton, M. A., Sengupta, A., Gopalan, V., Wrighton, K. C., . . . Ahmera, B. M. (2018). Identification of bacterial species that can utilize fructoseasparagine. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Sampson, C. C., & Fisher, B. J. (1980). Serratia: a continuing health menace. *Journal of the National Medical Association*, 865-8.
- Sarti, L., Martini, M., Brajon, G., Barni, S., Salari, F., Altomonte, I., . . . Novembre, E. (2019). Donkey's Milk in the Management of Children with Cow's Milk protein allergy: Nutritional and hygienic aspects. *Italian Journal of Pediatrics*.
- Savin, C., Criscuolo, A., Guglielmini, J., Le Guern, A. S., Carniel, E., Pizarro-Cerdá, J., & Brisse, S. (2019). Genus-wide Yersinia core-genome multilocus sequence typing for species identification and strain characterization. *Microbial Genomics*.

- Schnupf, P., & Sansonetti, P. J. (2019). Shigella Pathogenesis: New Insights through Advanced Methodologies. *Microbiology spectrum*.
- Senger, L. (2005). *Pathways to pregnancy and parturition* (segunda ed.). Estados Unidos: Mcgraw-Hil.
- Stürchler, D. (2019). Escherichia coli, a threat for babies, burgers and travelers. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 139.
- Tumini, M. N. (2019). Five-assay microbiological system for the screening of antibiotic residues. *Revista Argentina de Microbiología*, 1–9.
- U.S Department of Health and Human Services . (2015). Recuperado el 22 de 06 de 2020, de Los peligros de la leche cruda. Leche sin pasteurizar representa un riesgo grave para la salud: <https://www.fda.gov/food/buy-store-serve-safe-food/los-peligros-de-la-leche-cruda-la-leche-sin-pasteurizar-puede-representar-un-riesgo-grave-para-la>
- UNISENSOR. (2016). *unisensor diagnostic engineering*. Recuperado el 22 de 06 de 2020, de Trisensor milk BTS MRL tests- kit035: <https://unisensor.be/en/catalog/trisensor-kit035~49298c19-9cbf-4952-940a-876e495a57a1>
- Urroz, C. (2001). *ELEMENTOS DE ANATOMIA Y FISIOLOGIA ANIAL*. Recuperado el 12 de Abril de 2020, de <https://books.google.com.ec/books?id=K25RmJ28OCQC&pg=PA232&lp g=PA232&dq=anatomia+glandula+mamaria+cabras&source=bl&ots=bC5uEC5LQh&sig=Mq1zpYtWg5QefTaA88dlhwa7aJA&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiv872XvtfLAhXL0h4KHZdyAcYQ6AEIUDAL#v=onepage&q=anatomia%20glandula%20ma>
- Vincenzetti, S. F. (2014). Hipoalergenic properties of donkey's milk. *Preliminary estudy of milk* . Italia: ..
- Washington C. Winn, S. D. (2008). *Koneman Diagnostico microbiológico*. Editorial médica Panamericana.

- Werkman, C. H. (2001). AN IMPROVED TECHNIC FOR THE VOGES-PROSKAUER TEST. *Journal of Bacteriology*, 121.
- Xia, X., Liu, Y., Hodgson, A., Xu, D., Guo, W., Yu, H., . . . Wan, F. (2019). EspF is crucial for *Citrobacter rodentium*-induced tight junction disruption and lethality in immunocompromised animals. *PLoS Pathogens*.
- Yvon, S., Olier, M., Leveque, M., Jard, G., Tormo, H., Haimoud-Lekhal, D. A., . . . Eutamène, H. (2018). Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of ileitis in mice. *European Journal of Nutrition*, 155-166.
- Yvon, S., Schwebel, L., Belahcen, L., Tormo, H., Peter, M., Haimoud-Lekhal, D. A., . . . Jard, G. (2019). Effects of thermized donkey milk with lysozyme activity on altered gut barrier in mice exposed to water-avoidance stress. *Journal of Dairy Science*, 7697-7706.
- Zhu, Z., Shi, Y., Zhou, X., Li, B., & Zhang, J. (2018). Molecular characterization of fluoroquinolone and/or cephalosporin resistance in *Shigella sonnei* isolates from yaks. *BMC Veterinary Research*, 177.

ANEXOS

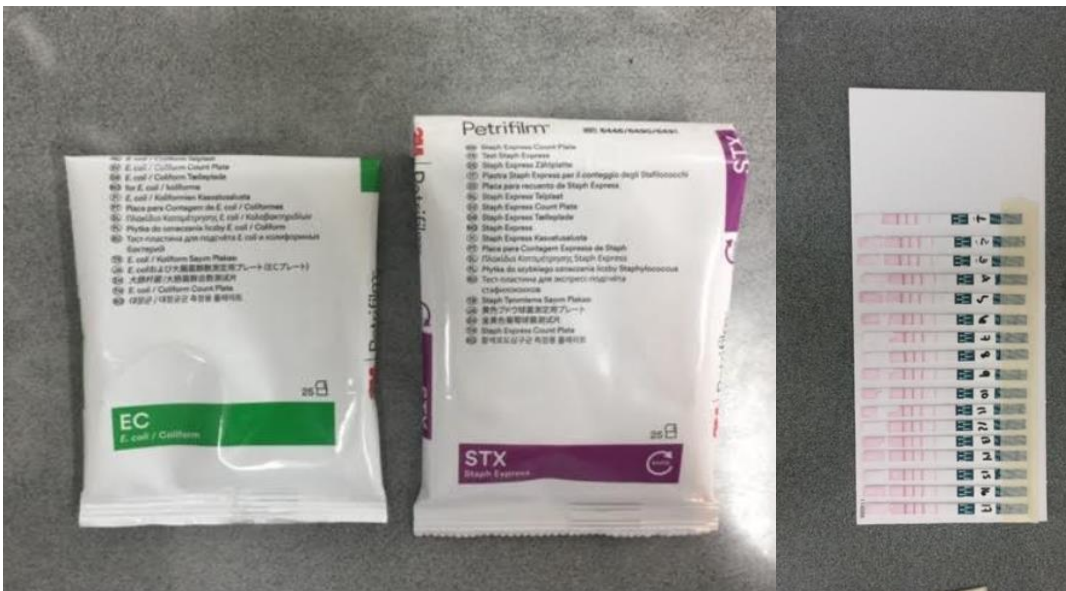
Anexos 1. Ubicación de los sectores y selección de los animales a muestrear.



Anexos 2. Recolección y etiquetado de las muestras.



Anexos 3. Procesamiento de muestras en el laboratorio.



Anexos 4. Procesamiento de muestras en el laboratorio.

