



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

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 VENEDORES AMBULANTES EN EL SUR DE LA CIUDAD DE QUITO

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el título de Médico Veterinaria y Zootecnia

Profesor Guía

MVZ David Francisco Andrade MgSc.

Autora

Geomary Cristina Malaver Marval

Año

2016

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

David Francisco Andrade Ojeda

Médico Veterinario Zootecnista MgSc. Tecnología de Alimentos

CI: 1712693165

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

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

---

Greomary Cristina Malaver Marval

CI: V-24090002

P: 124368198

## AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen del Valle, por protegerme siempre.

A mis padres, por el apoyo y la confianza incondicional.

A mi tutor David Andrade, por dirigir ésta investigación y ofrecerme las herramientas necesarias para culminarlo con éxito.

Al MVZ Carlos Gómez y al Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador, por prestarme sus instalaciones para realizar el análisis de las muestras.

A mi amiga Nathalie Amador, por ser mi ayuda y mano derecha durante la ejecución del trabajo de campo.

A la familia Loaiza Martínez, por acogerme en su hogar apenas emigré a éste país.

A la UDLA, por ser mi casa de estudio y recordarme que “EL MUNDO NECESITA GENTE QUE AME LO QUE HACE”.

Y a Ecuador, por ser el país que me permitió cumplir mi sueño más anhelado desde muy pequeña: ser veterinaria.

## DEDICATORIA

A mis padres, por ser los creadores de la persona que soy hoy en día y esforzarse por verme siempre feliz.

A mis hermanas, por ser mi complemento.

A mis abuelos Rubén y Chichí, que me cuidan desde el cielo; y a mis abuelas Yaya y Carmen, que sí tendrán la oportunidad de verme graduada.

A mi madrina Clara, por ser mi confidente y segunda mamá.

A Alessandro Autunno, por haber sido incondicional y recordarme que la fortaleza está en uno mismo, que nada es imposible.

A Stefani Delgado, Ma. Alejandra Ragueira, Valeria Baro, Marianna Hernández, Pablo Cohen y Samuel Andara, por ser la familia que sí podemos elegir.

A Nathalie Amador, Emilie de Genot, Pamela Quishpe, Erika Ortega y Estefany López, por hacerme sentir siempre en casa aunque me encuentre a cientos de kilómetros de ella.

Y al MVZ Carlos Martínez MgSc., por ser mi mentor y amigo a lo largo de mi formación pre profesional.

## RESUMEN

Existe una creencia popular en el sur de Quito, que denomina a la leche cruda de cabras como un producto que posee propiedades curativas cuando es ingerida. El consumo de productos lácteos crudos puede representar un problema para la salud pública, por lo tanto, en la presente investigación, se identificaron coliformes mediante el test API® 20 E, en la leche cruda de cabras que es expendida por vendedores ambulantes en el sur de Quito. Las muestras se recolectaron entre el 04 y 27 de abril del 2016, en 13 zonas diferentes del sector. Se obtuvieron y analizaron 94 muestras, de las cuales en el 11,7% (0,117 [0,047-0,17] IC 95%) se identificaron enterobacterias, siendo *Pantoea* spp. y *Escherichia vulneris*, los microorganismos aislados e identificados en mayor proporción. Se relacionaron las bacterias identificadas con enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), y el único género bacteriano que tuvo relación directa con ETA's, fue *Escherichia* spp., sin embargo, la especie identificada de éste género (*E. vulneris*), junto con los demás géneros y especies, estuvieron asociados mayormente a producir, como patógenos oportunistas, bacteriemias, infecciones urinarias, respiratorias y nosocomiales en humanos y animales. *Buttiauxella agrestis*, se relacionó principalmente como microorganismo con efecto probiótico en lácteos; *Rahnella aquatilis*, como antagonista fitopatógeno en la podredumbre de manzanas, y *Providencia rettgeri*, como bacilo valorado en la industria quesera. Por otro lado, las encuestas realizadas a la totalidad de productores, arrojaron que la mayoría cuentan con 1 a 5 animales en producción, llegando a 3 litros de leche al día. Las encuestas realizadas a transeúntes de las zonas de muestreo, revelaron que el 52,5%, consumían leche de éstos animales y únicamente el 12,5%, la hervía antes de ingerirla. Como en la mayoría de las muestras no se aislaron e identificaron enterobacterias, se realizaron pruebas para identificar antibióticos, que revelaron la presencia de tetraciclinas, lo que representa un problema para la salud pública, pues las enfermedades bacterianas en los seres humanos y animales, se tornarán más difíciles de curar, por la resistencia antibiótica que pueden desarrollar éstos microorganismos.

## ABSTRACT

In southern Quito, there is a popular belief that says drinking goats raw milk has healings properties when is ingested. Dairy raw intake may represent a problem for public health, so in this investigation it's been identified coliforms by running the test API® 20 E in raw goat milk that is expended by peddlers in southern Quito. The samples were recollected in April 2016 between the 04<sup>th</sup> and the 27<sup>th</sup>, in 13 different zones from that sector. Using samples of raw milk 94 of them were obtained and analyzed, from which the 11,7% (0,117 [0,047-0,17] IC 95%) identify *Enterobacteriaceae*, of those *Pantoea* spp. and *Escherichia vulneris*, were microorganisms identified and isolated in bigger proportion. All bacteria's were identified as foodborne diseases, and the only bacterial genus that had a direct relation with foodborne diseases was *Escherichia* spp., nevertheless the specie identified from this genus (*E. vulneris*), along with the others genus and species were mostly associated to produce, like opportunistic pathogens, bacteremia, urinary, respiratory and nosocomial infections in humans and animals. *Buttiauxella agrestis* it's mainly related as a microorganism with dairy probiotic effect; *Rahnella aquatilis* as an antagonist of the microorganism that produce rot in apples, and *Providencia rettgeri* as bacillus valued in cheese industry. On the other hand, the surveys realized to the totality of the producers showed, that most of them have 1 to 5 animals to sell the product, and these goats don't produce more than 3 liters of milk per day. Others surveys realized to people from the zone of the sampling area showed, that 52,5% of them consumed milk from those animals, and only the 12,5% boiled it before drink it. Most of the samples were not isolated nor identified as *Enterobacteriaceae*, they run quick test to detect antibiotics, and it reveals the presence of tetracycline's in the product, that represent a problem for public health because bacterian diseases in animals and humans may become difficult to heal because of the antibiotic resistance that can create those microorganisms.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	4
1.1 Problema.....	4
1.2 Objetivos .....	4
1.2.1 Objetivo general.....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	5
1.3 Hipótesis.....	5
1.3.1 Hipótesis alternativa .....	5
1.3.2 Hipótesis nula .....	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	6
2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) en los seres humanos .....	6
2.1.1 La leche cruda como causante de ETA's .....	6
2.1.2 Principales agentes etiológicos causantes de ETA's.....	7
2.1.3 Principales enfermedades de transmisión alimentaria.....	7
2.2 Generalidades de la glándula mamaria y la leche caprina... 9	
2.2.1 Glándula mamaria .....	9
2.2.1.1 Anatomía de la glándula mamaria .....	9
2.2.1.2 Fisiología de la secreción láctea.....	13
2.2.2 Mastitis.....	15
2.2.2.1 Mastitis bacteriana.....	16
2.2.3 Leche caprina .....	19
2.2.3.1 Características y composición .....	19
2.2.3.2 Bacterias en la leche .....	21
2.2.3.2.1 Bacterias no patógenas .....	21
2.2.3.2.2 Bacterias patógenas .....	22
2.3 Generalidades de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	23



2.3.1 Descripción de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	23
2.3.2 Enterobacterias de mayor importancia .....	25
2.3.2.1 <i>Escherichia</i> .....	25
2.3.2.2 <i>Shigella</i> .....	30
2.3.2.3 <i>Proteus</i> .....	32
2.3.2.4 <i>Salmonella</i> .....	32
2.3.2.5 <i>Klebsiella</i> .....	35
2.3.2.6 <i>Yersinia</i> .....	36
2.3.2.7 <i>Serratia</i> .....	37
2.3.2.8 <i>Enterobacter</i> .....	39
2.3.2.9 <i>Citrobacter</i> .....	40
2.3.2.10 <i>Hafnia</i> .....	41
2.3.2.11 <i>Providencia</i> .....	42
2.4 Aislamiento e identificación de enterobacterias .....	43
2.4.1 Actividades bioquímicas de las enterobacterias .....	43
2.4.1.1 Utilización de los hidratos de carbono .....	44
2.4.1.2 Actividad de la citocromooxidasa .....	44
2.4.1.3 Reducción del nitrato a nitrito .....	45
2.4.2 Medios de cultivos selectivos-diferenciales .....	45
2.4.2.1 Agar Levine ó EMB .....	45
2.4.2.2 Agar-hierro-triple azúcar o TSI .....	45
2.4.2.3 Agar Salmonella-Shigella (SS) .....	46
2.4.2.4 Agar Hektoen .....	46
2.4.2.5 Agar Mac Conkey .....	47
2.5 Pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de enterobacterias .....	47
2.5.1 Producción de Indol .....	47
2.5.2 Prueba del rojo de metilo .....	48
2.5.3 Prueba de Voges-Proskauer .....	48
2.5.4 Utilización de citrato .....	48
2.5.5 Producción de ureasa .....	49
2.5.6 Descarboxilación de lisina, ornitina y arginina .....	49

2.5.7 Producción de fenilalanina desaminasa .....	49
2.5.8 Producción de sulfuro de hidrógeno .....	49
2.5.9 Prueba de oxidasa.....	50
2.5.10 Motilidad .....	50
2.6 API® 20 E: prueba rápida para la identificación de enterobacterias.....	50
2.6.1 Definición .....	50
2.6.2 Pruebas bioquímicas que realiza el test .....	52
2.6.3 Lectura e interpretación de los resultados .....	53
<b>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
3.1 Ubicación geográfica y urbana.....	55
3.2 Diseño del estudio.....	57
3.3 Materiales y métodos .....	59
3.3.1 Materiales .....	59
3.3.1.1 Materiales utilizados en el trabajo de campo.....	59
3.3.1.2 Materiales utilizados para el análisis de las muestras .....	59
3.3.2 Métodos.....	61
3.3.2.1 Toma de las muestras .....	62
3.3.2.2 Análisis de las muestras en el laboratorio .....	64
3.3.2.2.1 Esterilización de las cajas de petri .....	64
3.3.2.2.2 Preparación del medio de cultivo .....	65
3.3.2.2.3 Siembra de las muestras.....	65
3.3.2.2.4 Lectura de los resultados .....	66
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>76</b>
4.1 Resultados.....	76
4.1.1 Identificación bacteriana .....	76
4.1.2 Encuestas a los productores.....	78
4.1.3 Encuestas a los posibles consumidores.....	81
4.2 Contraste de hipótesis .....	87
4.3 Discusión.....	88

4.4 Limitaciones del estudio .....	93
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y</b>	
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>95</b>
5.1 Conclusiones.....	95
5.2 Recomendaciones .....	96
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>115</b>

## INTRODUCCIÓN

La cabra es un animal reconocido mundialmente por su rusticidad, resistencia y la capacidad que tiene de sobrevivir en ambientes desérticos con escasos alimentos. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), emitió en el año 2013, un censo poblacional en el que se estimó un total de 975.803.263,00 cabezas de ganado caprino en los diferentes sistemas de producción, siendo el continente asiático, el responsable de la mayor cantidad de animales, con un total de 571.051.689,00. En el Ecuador, se reportó una población de 104.027,00 caprinos en ese mismo año (Servicio Ecuatoriano de Normalización- INEN, 2013). Cabe destacar, que la producción caprina en el país no tiene auge como los países desarrollados. Aréchiga *et al.* (2008) apuntaron que el apogeo en estos países, ocurrió porque cuentan con altos niveles tecnológicos, de rentabilidad económica e implementación de unos de los mejores programas de mejoramiento genético que aportan al desarrollo de sistemas de producción intensiva, trayendo como resultado la producción de 423 o más, millones de litros de leche caprina por año (Universidad de Córdoba, 2016).

La crianza de cabras a nivel nacional se ha incrementado en los diferentes ámbitos de producción tanto para la obtención de leche y carne como para la de piel y pelo (INEN, 2013). Así como existen ganaderías a lo largo del país enfocadas a la explotación de éstos animales, utilizando determinadas razas dependiendo del principal fin productivo, métodos de reproducción, protocolos sanitarios y un adecuado manejo; también existen pequeños ganaderos que crían cabras por medio del sistema de traspatio (crianza de animales de tipo mestizo en superficies pequeñas de terreno, principalmente en las viviendas, con instalaciones rudimentarias y alimentación no especializada), principalmente con fines productivos lecheros, que obvian protocolos básicos de sanidad. Una de las principales diferencias entre estos dos tipos de manejo, se basa en la cantidad de animales que se crían y explotan. Las producciones semi intensivas e intensivas, pueden criar desde 150 cabras, mientras que los

sistemas traspatio, cuentan con 5 a 10 animales. Sin embargo, la disponibilidad del espacio para la crianza de los animales, es uno de los factores que delimitará el tipo de sistema que se quiera desarrollar (Aréchiga *et al.*, 2008).

Un ejemplo de la crianza bajo el sistema traspatio, son los productores que se encuentran en el sur de la ciudad de Quito, criando animales bajo el método traspatio y expendiendo la leche a orillas de las carreteras. El principal problema de ésta forma de manejo de los animales y expendio del producto, es el desconocimiento de los riesgos de salud pública que pueden existir y que la población no considera al momento de consumirla. No obstante, se conoce existe una creencia popular que denomina a la leche cruda de cabras, como un producto que posee propiedades curativas cuando es ingerida, teniendo la capacidad de contrarrestar problemas respiratorios, circulatorios, de fertilidad, gripes, resfrío y controlar anemias A.Ramírez. (comunicación personal el 02 de abril del 2016).

Existe un estudio local relacionado al problema planteado, que identificó la presencia de *Brucella* sp. en cabras de las zonas urbanas de Quito mediante el análisis microbiológico, molecular y serológico de 100 muestras de leche, sangre y nódulos linfáticos, que demostró un 11,6% de positividad para la presencia de ésta bacteria (Zabala *et al.*, 2013). Este estudio aportó información importante para los organismos competentes de salud pública y animal, aunque concluyó dejando un campo amplio de investigación.

Existen otros estudios realizados a nivel internacional como el de Rolón, Castells, Sarquis, Rodríguez y Epifane (2013) y, Ludeña, Peralta y Arroyo (2006); que evaluaron las características microbiológicas de la leche fresca de cabra con el objetivo común de implementar protocolos, procedimientos y técnicas sanitarias para obtener leche de mejor calidad higiénica y nutricional que pueda ser utilizada de manera más óptima en industrias lecheras y queserías. Con el impulso y la colaboración de las autoridades de salud pública competentes en el Ecuador, también se podrían implementar protocolos,

procedimientos y técnicas sanitarias, que garanticen la aceptación de la leche cruda de cabras que se produce y expende en el sur de Quito, en empresas lecheras o queseras del país.

Específicamente en el sur de la ciudad de Quito, no se han hecho estudios que determinen la calidad higiénica de la leche cruda de las cabras mediante la identificación de patógenos bacterianos, como los coliformes, que abundan en ella y que representen un significativo impacto sanitario en los consumidores.

## **CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **1.1 Problema**

El consumo de leche cruda o sin pasteurizar es considerado un problema de salud pública, pues existe una alta probabilidad de que el producto contenga microorganismos potencialmente patógenos que ocasionen enfermedades en los consumidores y/o residualidad de antibióticos, pues no es tratada por una industria láctea que garantice la inocuidad y seguridad del alimento cuando es consumido (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013). En el sur de la ciudad de Quito, es común observar a vendedores ambulantes, expender leche cruda de cabras recién ordeñada a orillas de las calles. Los animales que utilizan para este fin, son criados bajo el sistema de traspatio y por lo tanto, se presume, no son sometidos a protocolos básicos de sanidad, por no contar con las condiciones y conocimientos óptimos de crianza de los animales. La mayoría de las personas que consumen este producto en el sur, lo hacen por creencia popular, pues han denominado a la leche cruda de cabras, como producto que posee propiedades curativas cuando es ingerida A.Ramírez. (comunicación personal el 02 de abril del 2016), sin percatar el impacto que esto puede ocasionar en la salud. Por esto, surge la necesidad de identificar posibles coliformes presentes en la leche cruda de cabras, que se expende en vasos o bolsas plásticas de forma indiscriminada, a orillas de las calles, en el sur de la ciudad de Quito.

### **1.2 Objetivos**

#### **1.2.1 Objetivo general**

Identificar 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.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Identificar criadores de cabras del sur de Quito para realizar la toma de muestras de leche cruda que expenden a orillas de las carreteras en el sur de la ciudad de Quito.
- Identificar las bacterias coliformes presentes en la leche cruda de cabras que se expende en el sur de la ciudad de Quito.
- Relacionar las bacterias identificadas con enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) que puedan ocasionar un riesgo de salud pública a la población.

### **1.3 Hipótesis**

#### **1.3.1 Hipótesis alternativa**

**H<sub>1</sub>:** La leche cruda de cabras que es expendida por vendedores ambulantes en el sur de la ciudad de Quito, presenta contaminación por bacterias coliformes que tienen relación con enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's).

#### **1.3.2 Hipótesis nula**

**H<sub>0</sub>:** La leche cruda de cabras que es expendida por vendedores ambulantes en el sur de la ciudad de Quito, no presenta contaminación por bacterias coliformes que tienen relación con enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's).



## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) en los seres humanos**

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) se definen como un síndrome ocasionado por el consumo de alimentos y/o agua que contengan agentes etiológicos en cantidades suficientes como para causar afección de la salud de un consumidor individual o de grupos de poblaciones. Las ETA's pueden considerarse de tipo infecciosa o de tipo toxicológica.

Las de tipo infecciosas están producidas por la contaminación de alimentos y/o agua por agentes etiológicos como bacterias, hongos o parásitos, capaces de multiplicarse en el sistema gastrointestinal y diseminarse a otros órganos. En cambio, las ETA's de tipo toxicológicas, están dadas por la ingestión de toxinas provenientes de plantas, animales, del metabolismo de microorganismos en los alimentos o sustancias químicas (Ruocco, Fiusa, Alallón y Salveraglio, 2010).

Los signos clínicos asociados a las infecciones por alimentos incluyen vómitos, náuseas, dolor abdominal, diarrea y fiebre. El cuadro clínico puede complicarse mostrando incluso signos nerviosos como cefalea, parálisis y estremecimiento (Acheson, 2014).

#### **2.1.1 La leche cruda como causante de ETA's**

La leche se encuentra dentro de la lista de los alimentos capaces de transmitir infecciones cuando es consumida cruda y presenta importancia clínica y epidemiológica por tener "(...) 150 veces más probabilidades de causar enfermedades transmitidas por alimentos (...)" que los productos pasteurizados (U.S Department of Health and Human Services, 2015).

El principal problema se debe a la presencia de diversos microorganismos que no son inhibidos por tratamientos físicos como la pasteurización antes de que

sea consumida, si éstos patógenos están presentes en el producto, ingresan al cuerpo humano y causan infecciones especialmente a recién nacidos, niños, mujeres embarazadas, ancianos o inmunosuprimidos (U.S Department of Health and Human Services, 2015).

### 2.1.2 Principales agentes etiológicos causantes de ETA's

Según U.S Department of Health and Human Services (2014) se denominan importantes los siguientes microorganismos: *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* patogénica, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Yersinia enterocolitica*.

En cambio, Guerrant y Bobak (1991) también consideran importantes a: *Brucella abortus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Corynebacterium diphtheriae*.

### 2.1.3 Principales enfermedades de transmisión alimentaria

- Salmonelosis: provoca brotes por la ingestión de productos contaminados de origen animal como la carne de res y de pollo, huevos y leche, por *Salmonella* spp. La forma más común de infección se da por la ingesta de éstos alimentos crudos. La manifestación clínica es la gastroenteritis aguda (Ruocco, Fiusa, Alallón y Salveraglio, 2010).
- Colibacilosis: producida por *Escherichia coli*, causante de afecciones severas principalmente en el sistema gastrointestinal, provocando diarreas acuosas, deshidratación, insuficiencia circulatoria, hiperpirexia e hipotensión, Ésta bacteria indica contaminación por materia fecal y generalmente se trasmite por la ingesta de carne de res cruda, quesos y leche no pasteurizada. Los bebés menores a un año son los más afectados (Cervantes, Chalte y Tapia, 2008 y López-Álvarez, s.f, pp.10-11).

- Shigelosis: enfermedad producida por *Shigella* spp., causante de diarreas capaces de producir alta morbilidad y mortalidad. Es más resistente a los ácidos estomacales que otras bacterias, y puede causar infección con una dosis infectante muy baja (Goldberg, 2013).
- Listeriosis: la enfermedad se manifiesta de 9 a 48 horas post consumo de alimentos contaminados como la leche cruda y los alimentos sin refrigerar. Las personas más susceptibles son las mujeres embarazadas, fetos y neonatos. Ocasiona fiebre, diarrea, cefalea, y dolores musculares en su cuadro gastroentérico, y artritis, endocarditis, abscesos cerebrales, peritonitis y osteomielitis, en su cuadro invasivo (Alcayaga y Hott, 2008, p. 188 y U.S Department of Health and Human Services, 2014).
- Yersiniosis: enfermedad producida por *Yersinia* spp. causada por la ingestión de carnes contaminadas, aguas no tratadas y leche sin pasteurizar. También es probable que se contraiga la infección mediante alimentos no cocidos como las ensaladas y los sándwiches (BC Centre for Disease Control, 2015). Acheson (2014) apunta que puede provocar diarreas con moco y/o sangre, dolor abdominal y fiebres ocurrentes.
- Brucelosis: enfermedad zoonótica ocasionada por el consumo de leche cruda y por el contacto directo con secreciones y tejidos infectados por *Brucella* sp.; causa la fiebre ondulante o fiebre de Malta, que se caracteriza por la presentación en los humanos de fiebres intermitentes, escalofríos, dolor general, cefalea y pérdida de peso (Magariños, 2000, p. 26 y Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2016, pp. 1-2).
- Campylobacteriosis: ocasiona diarrea con sangre, calambres, pirexia, dolores musculares, cefalea y náuseas específicamente en niños menores a 1 año de edad con duración de 2 a 10 días aproximadamente. El contagio ocurre por el consumo de leche cruda, carnes crudas o mal cocidas y aguas no tratadas (U.S Department of Health and Human Services, 2014).

## **2.2 Generalidades de la glándula mamaria y la leche caprina**

### **2.2.1 Glándula mamaria**

#### **2.2.1.1 Anatomía de la glándula mamaria**

La glándula mamaria caprina está recubierta por una capa fina de piel pigmentada cubierta de pelos delgados que termina en un pezón cónico de aproximadamente de 7 centímetros de largo por 3 centímetros de ancho (cuando la cabra está en periodo de lactación). La ubre se divide por medio del surco intermamario en 2 glándulas mamarias independientes ubicadas en la región inguinal; se encuentran cubriendo los muslos y tienen una proyección caudocraneal. Porcentualmente está constituida en un 70% por tejido cisternal y en un 30% por tejido glandular (Bedolla *et al.*, 2012, p. 10; Universidad de Castilla- La Mancha, 2016 y Urroz, 1991, p. 232).

Debajo de la piel se encuentra una fascia integrada por tejido conectivo elástico y en el medio de las 2 glándulas mamarias, la túnica abdominal. Esta túnica forma el tabique intermamario que se refuerza y transforma en el ligamento suspensorio intermedio de la ubre. El parénquima mamario tiene una coloración rosácea que guarda una consistencia más sólida que el tejido adiposo que rodea a cada glándula (Urroz, 1991, p. 232).

La *Figura 1* muestra al tejido secretor de leche compuesto por estructuras que reciben el nombre de "alvéolos"; cada alvéolo tiene capilares que permiten el intercambio metabólico de la glándula y la biosíntesis de la leche. Los alvéolos están rodeados por células mioepiteliales que desencadenan el reflejo de eyección de la leche, estas células se unen con tejido conectivo para dar origen a los "lobulillos". A su vez, estos lobulillos, dispuestos por grupos de 150 a 220 alveolos, también se unen con tejido conectivo y forman los "lóbulos" o "conductos lactíferos", los cuales drenan la leche a otros conductos más grandes que finalizan en la cisterna glandular de la ubre. Continuamente, la cisterna glandular de la ubre se comunica con otra de menor tamaño ubicada

en el pezón, ésta hace posible el pasaje de la leche hacia el exterior en presencia de estímulos externos. La cisterna glandular que se convierte en la cisterna del pezón, está separada por tejido conectivo denso en forma de anillos (Bedolla *et al.*, 2012, p. 12; Ferrando, 2013 y Urroz, 1991, p. 232).

A su vez, también expone las estructuras por las que está compuesto el pezón: en el extremo distal, se encuentra un orificio llamado el “meato del pezón” o “ducto papilar”, que se compone de estructuras convexas que se mantienen cerradas para evitar la salida espontánea de la leche o el ingreso accidental de microorganismos. Por encima de éstas estructuras se encuentra la “roseta de Fürstenburg”, la cual se abre por expansión al momento del ordeño. Al final de la tetilla existe un conducto rodeado por un esfínter de fibras musculares que regulan la salida de la leche (Ferrando, 2013 y Urroz, 1991, p. 235).

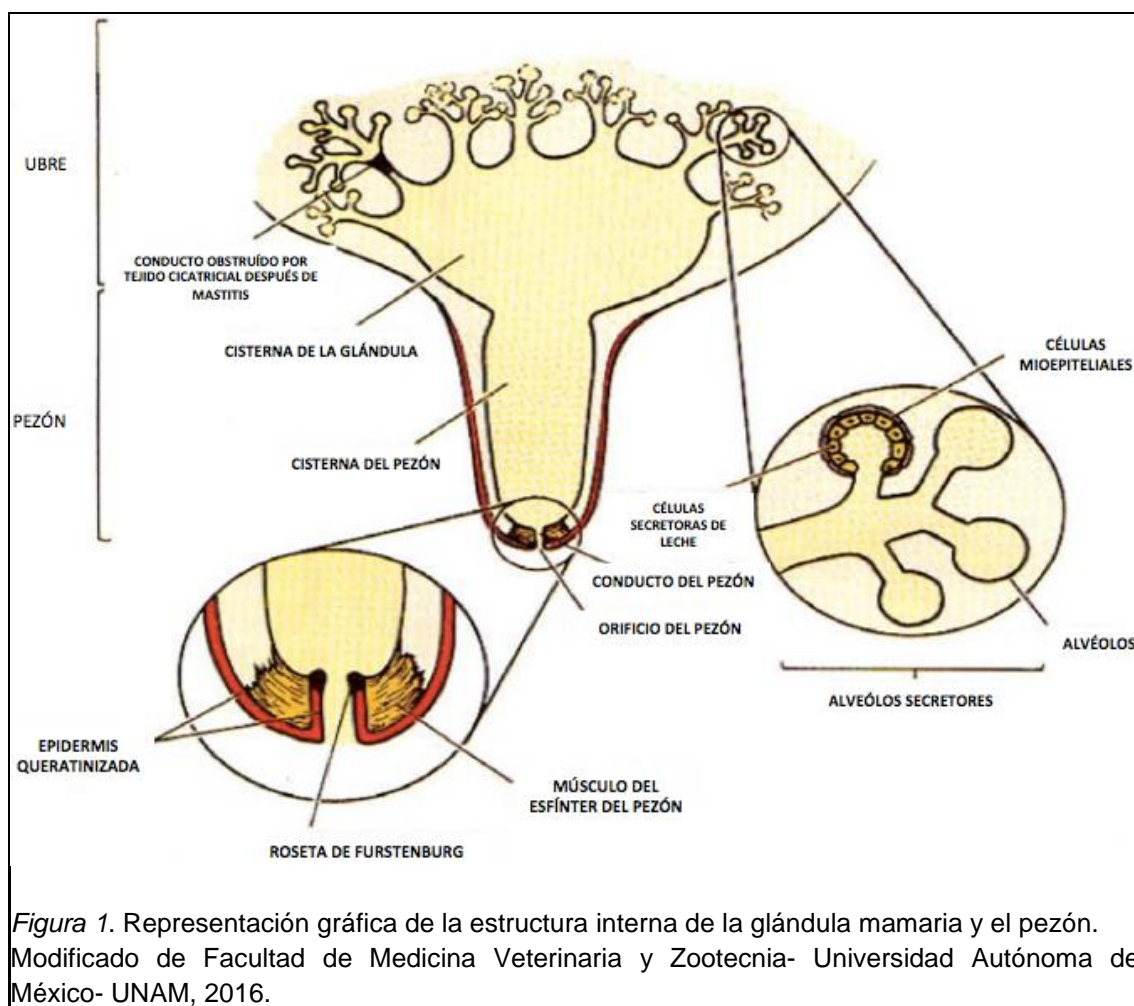


Figura 1. Representación gráfica de la estructura interna de la glándula mamaria y el pezón. Modificado de Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia- Universidad Autónoma de México- UNAM, 2016.

Existen varias formas de glándulas mamarias, pero se destacan 3 tipos: 1) de forma semejante a una pera, que representa la forma más común y aquella con capacidad ordeñable del 80%; 2) la forma ovalada, la cual muestra pezones de gran volumen independientes al tejido glandular; y 3) la forma globular, que posee menor capacidad cisternal que todos los tipos (Villegas, Bolaños y Olguín, 1986, p. 92).

La anatomía de la glándula mamaria también incluye al aparato suspensorio de la ubre que está conformada por tejidos blandos. Estos tejidos se clasifican desde afuera hacia adentro en 7 capas (Urroz, 1991, pp. 235-238):

- La primera capa ésta conformada por la piel que cubre a la ubre, la misma que aporta reducida estabilidad y suspensión a la glándula.
- La capa número 2 incluye la fascia superficial, que fusiona la piel con el tejido subyacente.
- La tercera capa forma la fascia superficial profunda, la cual une la superficie dorsal de las glándulas mamarias con la pared abdominal. El autor apunta que la laxitud de éste tejido, provoca en la mayoría de las veces la separación de la ubre de la pared abdominal.
- La cuarta capa la conforma las 2 láminas del ligamento suspensor lateral de la ubre constituido por tejido fibroso. Se sitúa hacia abajo, adelante y alrededor de la glándula hasta llegar a la cara interna del muslo. “Ambas capas se encuentran con el ligamento medial en la parte delantera y trasera de la ubre, luego se prolongan en láminas de tejido conectivo y penetran en la porción glandular (parénquima mamario) subdividiendo la ubre.” (Urroz, 1991, pp. 235-238). Este ligamento forma parte importante de la suspensión de la ubre.
- Enseguida, la capa número 5, está conformada por las mismas láminas de tejido conectivo mencionadas en la cuarta capa, constituyendo parte del parénquima mamario.

- La sexta capa dispone el tendón subpélvico, que a pesar de no formar parte del aparato suspensor de la ubre, se incluye porque a partir de él se originan las capas superficiales y profundas del ligamento suspensor lateral de la ubre.
- La última capa, la número siete, está formada por el ligamento suspensor medial o intermedio, compuesto por 2 láminas de tejido conectivo elástico. Las láminas proceden de la pared abdominal y se dirigen hacia la línea media que une las 2 glándulas mamarias. Este ligamento continúa lateralmente por los fragmentos anteriores y posteriores del ligamento suspensor lateral. Como el ligamento suspensor medial se ubica en el centro de la ubre, proporciona una estabilidad casi perfecta a las 2 glándulas mamarias. Si éste ligamento se debilita, ocasiona la llamada “ubre péndula”.

Con respecto al sistema de irrigación de la glándula mamaria, cabe mencionar que ésta posee irrigación arterial por medio de las arterias pudendas externas, que penetran el interior de las glándulas a través del canal inguinal; tienen una flexión sigmoidea que permite el descenso de la ubre cuando está llena de leche. Las arterias pudendas externas se convierten en el interior de la glándula, en la “arteria mamaria”, la misma que se bifurca en ramas arteriales pequeñas dirigidas hacia el ganglio linfático supramamario o inguinal. También se ramifica múltiples veces con la intención de originar arteriolas que rodean a cada alveolo mamario para brindarles aporte sanguíneo. Las arterias mamarias también alimentan el tejido conjuntivo de la ubre y los pezones (Urroz, 1991, pp. 238-239).

Por otro lado, el retorno venoso se realiza por medio de la vena pudenda externa y la vena subcutánea abdominal. El trayecto de la pudenda externa va hacia el contrario de las arterias y arteriolas respectivas, drenando la sangre en las ilíacas internas. Las ilíacas internas drenan el contenido en la vena cava, y esta última en el corazón. La vena subcutánea abdominal es una ramificación de la vena mamaria que se libera de la ubre para ingresar en la cavidad

abdominal junto con las venas torácicas internas; éstas confluyen hacia la vena cava craneal (Villegas, Bolaños y Olgún, 1986, p. 92).

Conjuntamente actúa el sistema linfático, estructura anatómica especial encargada de conducir la linfa desde los tejidos hacia el torrente sanguíneo; está compuesto por vasos linfáticos que drenan el líquido linfático hasta los ganglios linfáticos. El recorrido del líquido empieza en la ubre y se dirige hacia el ducto linfático y finalmente hasta el sistema venoso adyacente al corazón. Las cabras poseen un ganglio linfático grande ubicado en la mitad de la ubre y se conoce con el nombre de ganglio linfático supramamario o inguinal (Urroz, 1991, pp. 239-240).

Finalmente, la ubre también cuenta con un sistema de inervación dispuesto por los nervios inguinales (tienen función aferente o sensorial) y el plexo mesentérico posterior (función eferente). Cabe destacar que la glándula mamaria carece de fibras nerviosas parasimpáticas, y los nervios que producen sensibilidad a la ubre no tienen efecto alguno sobre la producción, secreción y composición láctea, ésta función es exclusiva del sistema endocrino (Urroz, 1991, p. 240).

### **2.2.1.2 Fisiología de la secreción láctea**

Las hormonas son las encargadas del inicio y el mantenimiento de la secreción láctea, y actúan en diferentes estadios para producir la leche. El lóbulo anterior de la hipófisis es el encargado de sintetizar el complejo hormonal lactógeno que inicia como consecuencia del parto, cuando los niveles de estrona y progesterona son muy bajos.

La secreción de la leche comienza cuando la corriente sanguínea que rodea a cada alveolo toma los nutrientes necesarios para la síntesis de leche: glucosa, aminoácidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos de cadena larga y ácido acético y  $\beta$ -hidroxibutírico. Cada uno de ellos determinará la cantidad y composición de la leche. Por otro lado, los lactocitos, células secretoras de



leche, ejercen 3 fases cíclicas: 1) la síntesis de la leche, 2) la excreción de la leche vertida en la luz del alvéolo y a su vez en la glándula mamaria, y 3) el reposo de éstas células al momento en que la glándula está totalmente llena (Alais, 1985, p. 15 y Callejo, 2010).

El control endocrino de la producción y eyección de la leche comienza a nivel de sistema nervioso central (SNC). “La adenohipófisis segrega prolactina, hormona somatotrópica (STH), hormona adenocorticotropa (ACTH) y hormona estimulante de las tiroides (TSH), mientras que en la neurohipófisis se produce oxitocina (...).” (Martín, Patón, Rota, Rojas y Tovar, 1994, p. 46).

La prolactina hace posible el crecimiento de las glándulas mamarias durante la preñez y posteriormente la producción de leche; la STH, regula el control del crecimiento de la glándula y estimula la actividad metabólica de los lactocitos; la ACTH, fusiona en la sangre las proteínas necesarias para la producción de leche; y la TSH, regula el metabolismo y crecimiento de la glándula mamaria (Hill, Wise y Anderson, 2006, p. 469 y Universidad de Chile, 2014).

La leche es producida por el epitelio que recubre los alvéolos, así la embriología demuestra que la glándula mamaria no es más que una glándula sudorípara modificada (Alais, 1985, p. 13).

Después de la secreción, se origina la eyección láctea gracias a la actividad de células que tienen relación con fibras musculares. La hormona encargada de ésta función es la oxitocina, pues activa la expulsión de leche mediante la contracción de células mioepiteliales que rodean a los alvéolos mamarios, dando como resultado la expulsión de la leche hacia los conductos lactíferos y la cisterna glandular (Barioglio, 2001, p. 224). Alais en el año 1985 (p. 15) afirmó que siempre debe existir la presencia de oxitocina para que la glándula mamaria se vacíe por completo, de lo contrario, se desaprovecharía un 20% de la capacidad total de leche dentro de la cisterna mayor.

La existencia de estímulos favorables y la ausencia de estímulos inhibidores, hacen posible la descarga de oxitocina en la sangre, la cual llega a la glándula mamaria en 40 segundos aproximadamente, con un periodo de acción de 5 a 6 minutos. Sin duda, el estímulo favorable más importante para que se desencadene la acción de la oxitocina, son los masajes directamente a la glándula mamaria por parte de la cría o por acción humana (Alais, 1985, p.16).

Los estímulos inhibidores se originan en situaciones de distress ocasionando interferencia en la descarga de oxitocina, o al contrario, estimulando la síntesis de adrenalina que produce contracción intensa de los principales vasos sanguíneos mamaros, que impiden la llegada de oxitocina a las células mioepiteliales. La evacuación de la leche depende del orificio o meato del pezón, mientras más estrecho sea este, más difícil de ordeñar será la cabra (Alais, 1985, p.16).

### **2.2.2 Mastitis**

La mastitis o inflamación de la glándula mamaria es considerada una de las peores enfermedades en las explotaciones lecheras caprinas, pues ocasiona grandes pérdidas económicas por los cambios físicos, bacteriológicos y químicos en la leche y patológicos en la ubre. La mastitis causa disminución en la producción de leche, contribuyendo al desecho de la misma una vez ordeñada. Se clasifica en mastitis clínica y mastitis subclínica dependiendo de la severidad del caso, y puede ser ocasionada por traumas, neoplasias, alergias y más comúnmente por infección bacteriana (Bedolla *et al.*, 2012, p. 24).

La mastitis subclínica se caracteriza por ocasionar inflamación que no se evidencia a simple vista y que sólo se puede apreciar mediante la medición de células somáticas en la leche. Éste tipo de mastitis es la que produce las mayores pérdidas económicas porque es desapercibida por los productores. Es la forma de presentación mastítica más frecuente, la de mayor duración, de

difícil detección, afecta la calidad lechera, reduce la producción láctea y lo más importante, precede a la mastitis clínica (Bedolla *et al.*, 2012, p. 24).

En cambio, la mastitis clínica muestra cambios visibles en la glándula mamaria con regiones endurecidas y presencia de nódulos; la leche es obtenida de la ubre con coágulos o flóculos, pus, sangre y puede presentar cambios en su coloración. Ésta mastitis es clínica-subaguda cuando se evidencian pocas alteraciones en la leche y sensibilidad en la ubre, y mastitis gangrenosa o clínica-sobreaguda cuando ocasiona muerte del animal por septicemia (Bedolla *et al.*, 2012, p. 25).

A pesar de ser una de las principales enfermedades en animales de producción, la mastitis en pequeños rumiantes no es tan común como sucede en los bovinos, pero se ha estimado una prevalencia particularmente en cabras del 5% para las mastitis clínicas y del 5 al 30% para las mastitis subclínicas. Los principales brotes de mastitis en éstos animales ocurren después del parto, posiblemente por la contaminación del suelo (Markey *et al.*, 2013, p. 434).

El consumo de leche cruda proveniente de glándulas mamarias con mastitis genera un impacto importante en la salud pública, pues como se explicó anteriormente, la mayoría de las veces son provocadas por bacterias que también son capaces de enfermar a los seres humanos.

### **2.2.2.1 Mastitis bacteriana**

Es la principal forma de presentación de mastitis, encontrándose numerosos agentes etiológicos con diferente grado de patogenicidad, mecanismos de invasión a la ubre y hábitat donde se desarrollan. Existen patógenos mamarios o contagiosos que se transmiten desde una ubre infectada a otra sana, por medio de fómites como los equipos de ordeño, y otros patógenos denominados medioambientales que habitan en las camas, el agua, el suelo y el estiércol. La diferencia entre los patógenos contagiosos y los medioambientales radica en la

capacidad infectiva y por lo tanto la forma de presentación de la mastitis (Bedolla *et al.*, 2012, p. 26).

La Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) describió en el año 2006, 3 etapas de actividad bacteriana para que se produzca la enfermedad, las cuales son:

- Etapa de invasión: Los microorganismos se trasladan desde la ubre superficial hasta la cisterna del pezón donde está la leche.
- Etapa de infección: Multiplicación bacteriana a lo largo de toda la glándula mamaria.
- Etapa de inflamación: Unión de las etapas anteriores que producen la mastitis. En ésta etapa incrementan considerablemente las células somáticas en la leche.

Los patógenos mamarios y medioambientales que se incluyen son: los estafilococos coagulasa positivos y negativos, varias especies de estreptococos (*S. agalactiae*, *S. uberis* y *S. dysgalactiae*), Mycoplasmas (*M. mycoides*, *M. agalactiae* y *M. capricolum*), *Pasterella haemolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium* spp., *Clostridium* spp., *Actinomyces* y enterobacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Yersinia* y *Enterobacter*. Todas estas especies bacterianas tienen la capacidad de penetrar el canal del pezón y colonizarlo hasta extenderse a la glándula mamaria para provocar la enfermedad (Ayala, 2009; Bedolla *et al.*, 2012, p. 26 y Sticotti *et al.*, 2013, p.1).

Estudios realizados en España apuntan que las mastitis bacterianas en cabras son ocasionadas en un 44% por *Staphylococcus* coagulasa negativo, en un 20% por enterobacterias, 11% por *Staphylococcus aureus*, 1,9% por *Bacillus* spp., 2,8% por *Mycoplasma* spp., 9,7% por *Micrococcus* sp. y el porcentaje

restante se desconoce (Ayala, 2009). Los principales signos clínicos que producen éstos patógenos son: abscesos en la ubre, inflamación generalizada, dolor, pirexia, anorexia, coágulos de sangre y flóculos en la leche. En cambio, en México se aislaron en cabras con mastitis clínica y subclínica, *Staphylococcus* (49,4%), *Pasterella* (11,49%), *Bacillus* spp. (5,72%), *Klebsiella* (1,14%), y *Streptococcus* (3,42%) (Zabaleta, 2011).

En el año 2012, el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) bajo la Norma Técnica NTE INEN 2624:2012 apuntó dentro de los requisitos para el procesamiento de leche cruda de cabras, tener como límite máximo 700.000 células somáticas por ml, rango que es superado cuando la leche presenta contaminación por bacterias, por eso, las explotaciones caprinas deben realizar periódicamente el conteo de leucocitos en la leche (Markey, Leonard, Archambault, Cullinane y Maguire, 2013, p. 433)

Las mastitis por bacterias coliformes son ocasionadas en un 65% por *E. coli* durante los primeros dos meses de lactación, y es en el periodo seco en donde generalmente se contrae la infección. Las bacterias coliformes tienen la capacidad de replicarse rápidamente, pero es la respuesta inmune de los animales la que determina la velocidad de inclusión de células somáticas dentro de las glándulas mamarias, agravando el cuadro mastítico. La reacción inflamatoria que ocasiona la infección por enterobacterias causa muerte y lisis bacteriana y como consecuencia liberación de endotoxinas, responsables del 10% de muertes por septicemia. No obstante, las infecciones por coliformes tienden a durar aproximadamente 10 días (Markey *et al.*, 2013, p. 439).

Existe relación entre las mastitis ocasionadas por coliformes y el mal manejo sanitario de los animales, pues son bacterias que normalmente viven en el intestino y por ende, se encuentran dispersas a lo largo del medioambiente. Las cabras contraen la infección cuando están en constante contacto con heces o materiales contaminados por ellas (Markey *et al.*, 2013, p. 440).

La prevención y control de las mastitis forma parte importante de los protocolos sanitarios en las producciones lecheras para evitar o disminuir pérdidas económicas. Se debe dar mantenimiento y buen uso a los equipos de ordeño, seguir procedimientos adecuados de ordeño, manejar correctamente a los animales en el periodo seco, tratar oportunamente las mastitis clínicas en la fase de lactación, mantener registros, proteger a los animales de medios ambientes sucios y examinar constantemente el estado de salud de las ubres (UNAM, 2016).

### **2.2.3 Leche caprina**

#### **2.2.3.1 Características y composición**

Las características y composición de la leche de cabra difiere con la ovina, bovina y humana destacándose por presentar “4,25% de grasa, 4,27% de lactosa, 3,52% de proteínas (...), 8,65% de sólidos no grasos, 12,90% de sólidos totales y 87,1% de agua (...)”. Además, posee aproximadamente una energía de 70 a 86 cal/100 ml, de 114 a 163 mg/100 ml de calcio, un pH de 6,33 a 6,52 y una densidad a 15 grados Celcius (° C) de 1.028 a 1.035 gr/cm<sup>3</sup> (Barioglio, 2001, p. 185).

La leche de cabra contiene 13% más calcio que la leche de vaca pero no aporta buena fuente de magnesio, hierro, cobalto y cobre (Chacón, 2005, pp. 240-241); sin embargo, The National Research Council (NRC) apuntó en el año 1968 que los requerimientos nutricionales de mujeres embarazadas, mujeres amamantando y adolescentes, se cubren con tan sólo 2 tazas de leche de cabra, en cambio, para cubrir los mismos requerimientos nutricionales en las mismas personas, se necesitan 3 tazas de leche de vaca.

El porcentaje de selenio en la leche caprina descremada alcanza el 94%, en cambio, en la leche entera se asocia con un 69%, lo que significa que el selenio se vincula más a la porción acuosa de la leche que a la porción grasa. Con respecto a la vitamina A, ésta posee 2.074 unidades internacionales por litro

(UI/l) versus la leche de vaca que contiene 1.560; ésta cantidad explica que los carotenoides ausentes en la leche caprina ya se encuentran convertidos en vitamina A. También posee 350% más Niacina que la leche de vaca y 25% más vitamina B<sub>6</sub> (Chacón, 2005, p. 243).

Chacón (2005, pp. 243-244) señala que contiene de 1 a 14% menos lactosa que la leche de otros animales mamíferos, por lo tanto, presenta menos problemas gastrointestinales y alérgicos asociados a intolerancias. Adicionalmente, el autor también apunta que presenta ácidos grasos de cadena corta, media y larga que son muy digestibles y tienen la capacidad de ser utilizados como energía para el organismo, en vez de depositarse como tejido adiposo.

A continuación se presenta una tabla comparativa resumen de algunos componentes de la leche de cabra con respecto a otras especies en base a 100 gramos.

Tabla 1. Composición comparativa de la leche caprina versus la leche de vaca, oveja y humana.

Componente	Cabra	Vaca	Oveja	Humana
Grasa (g)	4,5	3,7	7,4	2 - 4,5
Magnesio (mg)	0,018	0,003	11	0,026
Calcio (mg)	134	133	183	32
Hierro (mg)	0,05	0,03	0,07	0,03
Fósforo (mg)	111	92	0	14
Sodio (mg)	50	60	30	17
Lípidos totales (%)	4,14	3,34	3,1	3,8
Colesterol (mg)	11	10	11	14
Energía (kJ)	288	257	96,7	291
Carbohidratos (%)	4,45	4,5	4,7	6,89
Lactosa (g)	3,8	4,9	7,9	6,98
Vitamina E (mg)	0,07	0,06	0	0,08
Vitamina D (UI)	12.000	40.431	38.000	4.000
Vitamina A (UI)	185	126	170	64
Proteína total (%)	3,56	3,29	6,2	1,03
Vitamina B <sub>6</sub> (mg)	0,05	0,04	0,08	0,015
Caseínas (g)	3,49	2,8	4,2	0,4
Nitrógeno no proteico (%)	0,4	0,2	0,8	0,5

Nota: g: gramos; mg: miligramos; kJ: kilojoules; UI: unidades internacionales.

Adaptada de Chacón, 2005, p. 241; Bedoya, Rosero y Posada, 2016, p. 95; Ochoa, Vega, Ochoa, Bisset y Torres, 2009, párr. 5-6 y Gómez, 2010.

### 2.2.3.2 Bacterias en la leche

#### 2.2.3.2.1 Bacterias no patógenas

Son las llamadas bacterias lácticas que ayudan a conformar la textura normal de la leche, aportar sabor, aroma y condiciones óptimas para la elaboración de



productos lácteos; la mayoría de éstas ayudan a la conservación de la leche, a prolongar la vida de los productos lácteos, inhibir especies bacterianas patógenas Gram Positivas y Gram Negativas, brindar efectos probióticos que mejoran el tracto gastrointestinal de los humanos y a estimular el sistema inmunológico. Los *Micrococcus* son los que representan la microflora inocua más abundante en la leche, pero también se incluyen algunas enterobacterias proteolíticas que no fermentan la lactosa como *Serratia* y *Proteus*. Las bacterias patógenas que generalmente son inhibidas por éstos microorganismos no patógenos son: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Salmonella* sp., *Pseudomona* sp. y *E. coli* (Alais, 1985, p. 330 y Heer, 2007, p. 14).

Lo mencionado anteriormente se confirma por medio de estudios realizados en Diciembre del 2014 (Perin y Nero, p. 2) y Enero del 2008 (Martín del Campo, Gómez y Alaníz, pp. 2-4), en donde mencionan que algunas de las bacterias con actividad antimicrobiana en la leche cruda de las cabras son: *Lactococcus lactis*, *Enterococcus*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus* y *Carnobacterium divergens*.

Otros microorganismos que le confieren características deseables a la leche son: *Propionibacterium shermanii*, *Leuconostoc* sp. y *Streptococcus paracitrovorus* (Revilla, 1996, p. 60).

#### **2.2.3.2.2 Bacterias patógenas**

Las especies que forman parte de la microflora normal en la leche y los productos lácteos son aquellas capaces de fermentar la lactosa, sin embargo, aunque las enterobacterias no se consideran patógenos lácteos específicos, utilizan la lactosa como fuente nutritiva para su replicación y la presencia de ellas indica contaminación de origen fecal. Las enterobacterias no suelen estar presentes en la leche como otras Gram Negativas pero su presencia tiene importancia higiénica y tecnológica (Alais, 1985, pp. 328-330).

La importancia higiénica de varias especies de la familia *Enterobacteriaceae* en la leche o productos lácteos, se basa únicamente en la capacidad que tienen de provocar enfermedades infecciosas responsables de brotes epidémicos. La *Salmonella* sp. es el género más temido, pues se le atribuyen principalmente infecciones gastrointestinales. La presencia de la mayoría de enterobacterias en la leche guarda importancia organoléptica indeseada, pues cambian el sabor y olor de la misma llevándola a la rápida descomposición (Alais, 1985, p. 330).

La importancia higiénica y tecnológica aumenta por la capacidad que tienen de desarrollarse a diferentes temperaturas, desde los 10° C hasta los 44° C. Esta característica ocasiona que las enterobacterias suplanten a las saprofíticas lácteas y empiecen a replicarse e invadir el medio. Las más comunes son *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Shigella* y *Enterobacter* (Alais, 1985, p. 330).

A parte de las enterobacterias, también se consideran patógenas de la leche: *Staphylococcus aureus*, *Brucella* sp., *Pseudomonas*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycobacterium avium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Aerobacter aerogenes* y *Microbacterium* (Revilla, 1996, p. 67 y Vázquez-Ojeda, Pérez-Morales, Hurtado-Ayala y Alcántara-Jurado, 2014, pp. 91-97).

## **2.3 Generalidades de la familia *Enterobacteriaceae***

### **2.3.1 Descripción de la familia *Enterobacteriaceae***

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por un grupo de 40 géneros y más de 180 especies, muchas de ellas sin importancia clínica para los animales y el hombre. Son bacterias Gram Negativas con forma de bastón que miden de 1 a 3 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de largo por 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente. Constan de una envoltura multilaminar que se divide en una membrana interna o citoplasmática, otra externa básica y una última también externa pero más compleja. La unión de todas estas membranas forman una capa que regula la

migración de nutrientes, macromoléculas, metabolitos e incluso antibióticos betalactámicos (Markey *et al.*, 2013, p. 239 y Stanchi, 2007, p. 95).

La membrana interna está constituida por una doble capa de fosfolípidos; la externa básica, por un peptidoglucano delgado que consta de una alta cantidad de proteínas y la membrana externa compleja, por otra capa doble de fosfolípidos, lipoproteínas, proteínas porinas multímeras y flagelos que permiten la movilidad de las bacterias (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

El nombre de ésta familia está dado por el lugar en donde se encuentran a manera de microorganismos saprofíticos -en el tubo digestivo-, sin embargo, también pueden encontrarse en el agua, la vegetación y el suelo. Forman parte de la flora intestinal normal de muchos animales, incluyendo a los seres humanos. El término “coliforme” o “bacteria coliforme” no tiene significado taxonómico pero es usado para referirse a todos los miembros de enterobacterias que usualmente fermentan la lactosa como *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (Markey *et al.*, 2013, p. 239 y Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

Las enterobacterias pueden dividirse en 3 grupos de acuerdo a la patogenicidad que causan en los animales: 1) principales agentes patógenos, como la *Salmonella*, *Escherichia coli* y tres especies de *Yersinia*; 2) patógenos oportunistas que se sabe causan infección en los animales, como el género *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Edwardsiella*, *Citrobacter* y *Shigella* y 3) organismos que no tienen importancia infecciosa en los animales, en ésta clasificación se incluyen especies de 17 géneros de *Enterobacteriaceae* como *Tatumella ptyseos* y *Moellerella wisconsencis* (Markey *et al.*, 2013, p. 248).

Para el aislamiento de enterobacterias de muestras que se presuman tengan una gran cantidad de microorganismos, existen 3 clases de medios de cultivos: 1) medios no selectivos para aislamientos primarios, 2) agares selectivos y

diferenciales como el agar Mac Conkey y 3) caldos de enriquecimiento. Los medios de cultivos de importancia en el presente trabajo son los selectivos y diferenciales, los cuales están compuestos con diferentes ingredientes que tienen la particularidad de inhibir el crecimiento de algunas especies bacterianas (selectivo) y además detectar características bioquímicas de las bacterias presentes en las muestras (diferencial) (Koneman *et al.*, 2006, p. 211).

Un medio selectivo generalmente contiene peptona (compuesto resultante de la degradación de las proteínas), polipeptona (mezcla de dos tipos de peptonas), lactosa y/o sacarosa (azúcares), sales biliares (como inhibidor de crecimiento de algunos microorganismos), cloruro de sodio, agar (elemento solidificante para el medio de cultivo), rojo neutro (indicador de pH), violeta de genciana (indicador de pH y colorante) y agua destilada (Koneman *et al.*, 2006, p. 212).

Las enterobacterias tienen importancia en el ámbito de la salud pública a nivel mundial, pues son las protagonistas de brotes epidemiológicos por el consumo de alimentos contaminados con materia fecal, el principal nicho de estos microorganismos.

## **2.3.2 Enterobacterias de mayor importancia**

### **2.3.2.1 *Escherichia***

Éstas bacterias pueden o no ser móviles, fermentan la lactosa y son oxidasas negativas. Todas las bacterias de éste género producen enterotoxinas o citotoxinas que provocan shocks sépticos. Pueden encontrarse en muestras de heces, sangre, abscesos, secciones de intestino, leche, orina, hígado, riñón y bazo (Koneman *et al.*, 2006, p. 227).

Se encuentran de manera saprofítica en el intestino de los animales y los seres humanos, teniendo la capacidad de inhibir el crecimiento de otros

microorganismos mediante la liberación de bacteriocinas. Poseen 112 antígenos flagelares denominados "H", 176 somáticos denominados "O" y 91 capsulares denominados "K" (Rodríguez-Angeles, 2002, párr. 1).

La especie más importante es la *Escherichia coli*, y de ésta existen muchos serotipos identificados mediante la tipificación de los antígenos mencionados anteriormente. Por ejemplo, los "O" se localizan en la pared celular y no pueden diferenciarse de la porción antigénica de las endotoxinas que produce y son considerados aquellos que soportan temperaturas de 100 a 121° C; en cambio, los "K" no soportan altas temperaturas y están rodeando toda la célula a manera de cápsula (López-Álvarez, 2016, pp. 2-3).

Se aíslan en medios de cultivos selectivos diferenciales como el agar Mac Conkey y el agar Chromocult. Las colonias aisladas en agar Mac Conkey crecen de color rosado fosforescente como producto de la fermentación fuerte de la lactosa, y en el agar Chromocult, se visualizan de color azul negruzco. Se identifican en medios de cultivos como: 1) Caldo Rojo de metilo según Voges y Prokauer (MR-VP), 2) Agua de triptona y 3) Agar Citrato de Simmons (Markey *et al.*, 2013, p. 251 y Stanchi, 2007, pp. 97-98, 100-101).

*Escherichia coli* causa enfermedades por la ingesta de alimentos o agua contaminada tanto en animales como en seres humanos, afectando el sistema urinario, gastrointestinal, respiratorio, tegumentario y cardiovascular (Merino y Lösch, 2016).

El Instituto Colombiano Nacional de Salud (2011) apuntó que dentro de las especies de *Escherichia coli* con mayor importancia ETA's se encuentran: *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroagregante, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* de adherencia difusa:

- *E. coli* enteropatógena o EPEC: provoca infección en niños menores de 2 años de edad ocasionando diarrea acuosa, vómitos y fiebre. En países sub

desarrollados origina mortalidad en poblaciones infantiles del 20 al 50%. El factor principal de virulencia es la traslocación de proteínas altamente virulentas hacia los enterocitos, causando cambios en la función celular normal; ésta lesión es llamada adherencia y esfacelamiento (A/E) (Vidal-Graniel, 2003, p. 188-190).

- *E. coli* enterohemorrágica o ECEH: los caprinos se infectan con ésta bacteria sin presentar signos y la eliminan por las heces, pero los seres humanos se infectan por la ingesta de carne cruda, vegetales, frutas o leche contaminada por medio de cargas infectivas bacterianas muy bajas. Causa diarrea y/o colitis hemorrágica que predispone al desarrollo del Síndrome Urémico Hemolítico en niños, adultos y gerontes, alcanzando una mortalidad del 50% en pacientes inmunocomprometidos (Iowa State University, 2010, p. 1).
- *E. coli* enteroagregante o EAEC: causa diarreas agudas o persistentes en niños mediante la adherencia de la bacteria en los enterocitos, formando una biocapa con moco que tiene efecto citotóxico en la mucosa del intestino. El periodo de incubación es de 20 a 48 horas y los signos clínicos asociados a la enfermedad incluye diarrea con moco, sangre y fiebre (Organización Panamericana de la Salud, 2016).
- *E.coli* enteroinvasiva o EIEC: invade el epitelio intestinal y se adhiere a las microvellosidades de la mucosa para ingresar por endocitosis a la células, producir enterotoxinas y continuar infectando a otras células sanas (Rodriguez-Angeles, 2002, párr. 16).
- *E. coli* enterotoxigénica o ETEC: produce enterotoxinas que reducen la absorción e incrementan la secreción intestinal, por medio de una enterotoxina termolábil, otra termoestable y fimbrias de adherencia que tienen la suficiente fortaleza para infestar a niños menores de 2 años de edad. Predomina en los países en vías de desarrollo y se trasmite por agua o alimentos contaminados. Se incluyen los serogrupos 06, 08, 015, 020, 027,

0128, 0159, 0167, entre otros (Koneman *et al.*, 2006, p. 238; Markey *et al.*, 2013, p. 247 y Organización Panamericana de la Salud, 2016).

- *E. coli* de adherencia difusa o DAEC: tiene importancia clínica en niños menores de 6 años de edad, pues son los más susceptibles a la presentación de signos infecciosos que causa la bacteria: diarrea acuosa sin sangre. El mecanismo de infectividad no está bien descrito, pero se conoce origina estructuras en formas de dedos en los enterocitos que le confieren protección a la bacteria al momento de invadirlos. El nombre de adherencia difusa se atribuyó precisamente al mecanismo de acción desconocido (Rodríguez-Angeles, 2002, párr. 18).

A continuación la *Tabla 2* expone las principales características bioquímicas que presenta *E. coli*.

Tabla 2. Características bioquímicas de *E. coli*.

Prueba bioquímica	Positividad (%)
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
TSI- H <sub>2</sub> S	1
Hidrólisis de urea	1
Ácido de glucosa	100
Lisina descarboxilasa	90
Fenilalanina desaminasa	0
Movilidad a 36°C	95
Hidrólisis de gelatina	0
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de sacarosa	50
Reducción del nitrato a nitrito	100
ONPG	95

Nota: TSI- H<sub>2</sub>S: agar-hierro-triple azúcar y producción de ácido sulfhídrico;  
 ONPG: actividad de la β-galactosidasa.  
 Adaptada de Rodríguez-Angeles, 2002.

Es una bacteria resistente al medio por tener la capacidad de entrar en fases estacionarias, en donde su crecimiento es nulo cuando se agotan los nutrientes del medio en donde se encuentra. Para lograr ésto, produce varios mecanismos de defensa como: disminución del volumen celular y el número de flagelos peritricos, engrosamiento de la pared bacteriana, acumulación de mecanismos osmoprotectores y compuestos nutricionales de reserva y compactación del ADN y por consiguiente, disminución del metabolismo. Todas éstas características le confiere viabilidad para mutar y aumentar su resistencia e infectividad (Ramírez, Contreras y Gómez, 2005, p. 92).



### 2.3.2.2 *Shigella*

Bacterias inmóviles en sus 4 géneros, A: *Shigella dysenteriae*, B: *Shigella flexneri*, C: *Shigella boydii* y D: *Shigella sonnei*. Son uno de los microorganismos causantes de procesos diarreicos por la ingesta de alimentos y agua contaminada con materia fecal, con una dosis infectante muy baja: 200 microorganismos viables. Su ADN es similar al de *Escherichia coli* en un 70 a 75%, por lo tanto, está relacionada con ésta especie (Molina y Uribarren, 2015 y Scanlan, 1991, p. 93).

La bacteria una vez dentro del organismo coloniza y destruye los enterocitos en su replicación, causando diarrea con sangre, moco y posiblemente pus. *Shigella dysenteriae* tiene la particularidad de sintetizar la toxina "Shiga" que desencadena el Síndrome Urémico Hemolítico y problemas neurológicos. Cabe destacar que los animales domésticos no presentan casuística importante en el padecimiento de ésta enfermedad, en medicina veterinaria, se han reportado casos en primates no humanos (Carter, 1989, p. 174 y Merino y Lösch, 2016).

Las bacterias de éste género producen esporas, no tienen cápsula, son oxidadas negativas, fermentan la glucosa produciendo ácido o ácido y gas y son anaeróbicas excepto los biotipos del grupo B. Se pueden aislar bien en medios de cultivos selectivos diferenciales para enterobacterias como el agar Mac Conkey, agar *Salmonella-Shigella* (SS), agar Levine ó con Eosina y Azul de Metileno (agar EMB), y agar Hektoen. Su crecimiento se inhibe cuando se agrega bilis y verde brillante a un medio con tetracionato. Posee dos antígenos que los utiliza como factor de virulencia: 1) el antígeno "O" somático ó de pared celular, y 2) el antígeno "K" capsular (Stanchi, 2007, pp. 215-216).

Solamente algunas cepas de *Shigella sonnei* fermentan lentamente la lactosa. La viabilidad se ve comprometida en presencia de ácidos, sales biliares, desecación y desinfectantes; pero son capaces de sobrevivir durante meses en ambientes de 36° C.

Dentro del sistema gastrointestinal produce adherencia, invasión, inflamación y ulceración de la mucosa del íleon y el colon (Biblioteca Virtual en Salud-OPS/OMS Uruguay, 2016, pp. 39-41). Sahl *et al.* apuntó en el año 2015 (párr. 1) que ésta bacteria ocasiona aproximadamente 163 millones de episodios de shigellosis y 1,1 millón de muertes al año a causa de las diarreas significativas que produce.

La *Tabla 3* expone las propiedades bioquímicas más importantes de *Shigella* spp.

*Tabla 3.* Características bioquímicas más importantes de *Shigella* spp.

<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Movilidad	Negativo
Fermentadora de lactosa	Negativo
ONPG	Diferentes reacciones (depende de la especie)
Urea	Negativo
Indol	Diferentes reacciones (depende de la especie)
Citrato	Negativo
Sacarosa	Negativo
Lactosa	Negativo
Voges-Proskauer	Negativo
ADH	Negativo
Rojo de Metilo	Positivo
Sulfuro de hidrógeno	Negativo
Lisina descarboxilasa	Negativo

Nota: ONPG: actividad de la  $\beta$ -galactosidasa; ADH: actividad de la enzima Arginina-dihidrolasa. Adaptada de Algorta y Shelotto, 2008, p. 326; Lopardo, Predari y Vay, 2016, p. 84 y Terragno, Caffer y Binsztein, 2007, p. 6.

### 2.3.2.3 *Proteus*

Son bastones muy alargados y móviles por la presencia de flagelos peritricos, anaerobios facultativos, productoras de urea y presentan metabolismo respiratorio. Aunque existen muchas especies, *Proteus mirabilis* y *P. vulgaris* forman parte de la mayoría del género *Proteus* aislado clínicamente (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010 y Scalan, 1991, p. 115).

Las especies más importantes son: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri* y *P. hauseri*, las cuales tienen la capacidad de sobrevivir en objetos inanimados durante 2 a 3 días, es así como ocasionan del 3 al 6% enfermedades nosocomiales (Public Health Agency of Canada, 2011).

*Proteus* causa principalmente infecciones en el tracto urinario ocasionando cistitis, urolitiasis y pielonefritis. En cabras puede causar diarrea cuando también intervienen especies del género bacteriano *Providencia*. A pesar de que causa infecciones extraintestinales, se encuentra normalmente en el tracto intestinal de los animales y el hombre, así como en el suelo, aguas polucionadas, y en cadáveres en descomposición. Los principales factores de virulencia son las adhesinas y la hemólisis (Algorta y Shelotto, 2008, pp. 326-327; Carter, 1989, p. 173; Merino y Lösch, 2016 y Scalan, 1991, p. 115).

*Proteus* no es capaz de fermentar la lactosa, pero si produce ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) y utiliza el citrato para su metabolismo; se reporta que tiene buen aislamiento en muestras de orina sembradas en agar Mac Conkey a 37° C durante 48 horas con 5 a 7% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Kishore, 2012 y Merino y Lösch, 2016).

### 2.3.2.4 *Salmonella*

Es uno de los géneros más complejos de las enterobacterias por la homología de su ADN. La nomenclatura usada en la actualidad divide al género en dos

especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, dividiendo a su vez a *Salmonella enterica* en 6 sub especies (*S. enterica*, *S. salamae*, *S. indica*, *S. diarizonae*, *S. arizonae* y *S. houtenae*) que provocan la mayoría de enfermedades infecciosas (Biblioteca virtual en Salud [bvs], 2016).

Son bacterias que no fermentan la lactosa ni la sacarosa, casi todos sus serotipos son móviles, son anaerobios facultativos, oxidasas negativas, utilizan el citrato para su metabolismo, son Voges-Proskauer positivas y cuando crecen en agar sangre no producen hemólisis. No obstante, no todas las especies de *Salmonella* presentan el mismo comportamiento, por ejemplo, la *Tabla 4* expone los resultados de las pruebas bioquímicas de algunos serotipos y subespecies de *Salmonella*.

*Tabla 4.* Características bioquímicas más importantes de diferentes serotipos y subespecies de *Salmonella*.

Microorganismo	IND	RM	VP	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	LAC	SAC	GEL	LDC
<i>S. serotipo Gallinarum</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>S. serotipo Paratiphy A</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>S. serotipo Tiphy</i>	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>S. bongori</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> supespecie <i>indica</i>	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>S. enterica</i> supespecie <i>diarizonae</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>S. enterica</i> supespecie <i>arizonae</i>	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+

Nota: IND: producción de indol; RM: rojo de metilo; VP: Voges-Proskauer; CIT: utilización de citrato; H<sub>2</sub>S: producción de ácido sulfhídrico; URE: producción de ureasa; LAC: fermentación de la lactosa; SAC: fermentación de la sacarosa; GEL: hidrólisis de la gelatina; LDC: descarboxilación y desaminación de la lisina.

Adaptada de Koneman *et al.*, 2006, p. 234.

*Salmonella* invade la mucosa intestinal por medio de factores de adherencia, movilidad y quimiotaxis en las microvellosidades de las células intestinales, penetrando el intestino delgado y grueso. Pueden lisar los macrófagos que las

fagocitan durante su replicación bacteriana, así como a los enterocitos. Cuando logran destruir a los macrófagos, éstos accidentalmente las transportan por vía linfática empeorando el cuadro clínico (Carter, 1989, p. 173 y Scalan, 1991, p. 99).

Además producen diarrea relacionada al consumo de alimentos contaminados con materia fecal e incluso mediante su inclusión en los macrófagos, puede provocar neumonías, abscesos, septicemias, procesos fébriles, vómitos y abortos. Están presentes en el tracto intestinal de los animales y seres humanos formando parte de la flora intestinal; sin embargo, pueden tener cambios transitorios que provoquen enfermedades persistentes de alta mortalidad (Grant, 2016, p. 169; Merino y Lösch, 2016 y Scalan, 1991, pp. 98-99).

Algorta y Shelotto (2008, pp. 323-324) señalan que puede dividirse según sus características patogénicas en:

- Forma digestiva: causando gastroenteritis e intoxicaciones alimentarias.
- Forma septicémica: ocasionando la fiebre tifoidea, una de las enfermedades más graves.
- Formas diversas: son las menos frecuentes pero ocasiona osteítis y meningitis.

Sus factores de patogenicidad son: 1) invadir el epitelio intestinal atravesando mucosas y submucosas, 2) producir endotoxinas mediante los polisacáridos presentes en su pared celular, 3) sobrevivir dentro de los macrófagos que infecta gracias al antígeno de virulencia (Vi) (sólo en *S. tiphy*, *S. paratiphy* y *S. dublin*) y 4) sintetizar enterotoxinas.

Dentro de la *Salmonella enterica* existen aproximadamente 2000 serotipos, es por esto, que comúnmente se las llama por el nombre del serotipo más

importante: *Salmonella typhi* o *Salmonella enteritidis*, dependiendo del caso. La *Salmonella* como causante ETA's puede provocar infecciones que duren hasta 2 semanas, incluyendo vómitos, dolor abdominal, náuseas, mareos y diarrea (Algorta y Shelotto, 2008, pp. 323-324).

El diagnóstico se basa en la recuperación de *Salmonella* de muestras ambientales, alimentos contaminados, heces, sangre, orina, necropsias de animales o piensos. Las muestras se siembran en medios de pre-enriquecimiento como el agua de peptona tamponada, después en medios de enriquecimiento con sustancias inhibidoras de otros microorganismos como el caldo Muller-Kauffman y por último, en medios selectivos para diferenciarla de otras enterobacterias como el agar verde brillante. No obstante, crecen bien en agar SS, agar Hektoen, agar Mac Conkey, y agar xilosa-lisina-desoxicolato (OIE, 2008, p. 1 y Stanchi, 2007, pp. 210-211).

Para confirmar las cepas que se aíslan, se realizan pruebas serológicas, bioquímicas y moleculares de colonias puras por medio de la identificación de los antígenos "O" somáticos, los "H" flagelares y los "Vi" de virulencia (Stanchi, 2007, pp. 212).

#### **2.3.2.5 *Klebsiella***

No produce esporas, no tiene cápsula, son inmóviles, fermentan la lactosa, la glucosa y son productoras de endotoxinas. Se encuentran distribuidas en la naturaleza y en el tracto intestinal de los animales y el hombre de forma natural (Stanchi, 2007, p. 204). Scanlan (1991, p. 111) describió que adicionalmente ésta bacteria puede encontrarse en productos de la madera, y es común que muchos animales domésticos contraigan la infección a partir de ésta fuente.

Ésta es una de las bacterias que causan neumonías con curso grave y generalmente fatal ocasionando la muerte de los animales, específicamente la de los neonatos. La especie más representativa dentro de éste género es la *Klebsiella pneumoniae* (Koneman *et al.*, 2006, p. 250).

También es capaz de producir metritis y cervicitis, mastitis, infecciones de heridas, abscesos corneales, destrucción granulomatosa de la nariz y la faringe, meningitis, pleuritis, hemorragias y cuadros de septicemia. Tiene factores de virulencia específicos en forma de antígenos que le conceden resistencia dentro del hospedador que infecta: el antígeno somático "O", el antígeno capsular "K" y el ciliar "H". De éstos tres antígenos, está descrito que el "K" es el más importante en cuanto a la resistencia que le confiere, pues se encuentra recubriendo la bacteria y es el que evita que las células fagocíticas la destruyan (Stanchi, 2007, p. 203).

La Organización Panamericana de la Salud no considera a *Klebsiella* patógeno contaminador del agua de consumo, al contrario, apunta que forma parte de la biopelícula del agua (2016, párr. 5). Sin embargo, puede llegar a ser más patógena que la *E. coli* como agente etiológico en infecciones nosocomiales (Merino y Lösch, 2016).

Crece bien en agares enriquecidos como el agar sangre o en medios selectivos diferenciales para enterobacterias como el agar Mac Conkey a 37° C. Sus colonias son grandes, de aspecto mucoso y convexas. Tienen metabolismo respiratorio y fermentativo (Scanlan, 1991, pp. 111-112).

#### **2.3.2.6 *Yersinia***

Son cocobacilos de pequeño tamaño, móviles por flagelos peritricos cuando crecen a menos de 30 ° C, e inmóviles cuando crecen a más de 37° C; pero *Y. pestis* siempre es inmóvil, a pesar de la temperatura en la que se desarrolle (Scanlan, 1991, p. 121).

*Yersinia* antes era llamada *Pasteurella*, está conformada por 3 especies potencialmente patógenas para el hombre y los animales: 1) *Y. pestis*, 2) *Y. pseudotuberculosis*, y 3) *Y. enterocolitica*. La primera obtuvo dicho nombre porque produce una peste zoonótica que la transmiten las ratas a los humanos por medio de la picadura de una pulga (Merino y Lösch, 2016). La segunda

produce pseudotuberculosis en roedores, orquitis y epididimitis en caprinos, infecciones en porcinos e infección de ganglios linfáticos, hígado y bazo en animales menores. La tercera produce gastroenteritis, adenitis e infecciones más frecuentemente en los animales que en el hombre (Carter, 1989, p. 181).

Su identificación se basa en observación de colonias poco perceptibles o puntiformes expuestas en medios de cultivos selectivos diferenciales para enterobacterias (Scanlan, 1991, pp. 121-122). La *Tabla 5* expone las principales características bioquímicas que muestra *Yersinia*.

*Tabla 5.* Resultados de pruebas bioquímicas más importantes de las 3 especies de *Yersinia* mencionadas anteriormente.

Microorganismo	IND	RM	VP	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	LAC	SAC	LDC
<i>Y. pestis</i>	-	+	-	s/d	+	-	-	-	s/d
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+

Nota: IND: producción de indol; RM: rojo de metilo; VP: Voges-Proskauer; CIT: utilización de citrato; H<sub>2</sub>S: producción de ácido sulfhídrico; URE: producción de ureasa; LAC: fermentación de lactosa; SAC: fermentación de sacarosa; LDC: descarboxilación y desaminación de la lisina; s/d: sin datos específicos.

Adaptada de Koneman *et al.*, 2006, p. 259, Suárez, 2009, p. 67 y MacFaddin, 2003, p. 411.

s/d: sin datos específicos.

### 2.3.2.7 *Serratia*

Son bacterias que se consideraban saprofitas, pero por la capacidad invasora y de resistencia a muchos antimicrobianos fue denominada en la actualidad como patógena oportunista. *Serratia marcescens* es la más importante dentro de las enfermedades en los humanos, y se asocia a neumonías y graves septicemias; en cambio, en animales, es asociada con cuadros de mastitis. Sin embargo, existen otras especies de *Serratia* que aunque rara vez son reportadas, tienen también la capacidad de infectar a los seres humanos y en



menor proporción a los animales, éstas son: *S. plymuthica*, *S. liquefaciens*, *S. rubidaea*, *S. odorifera* y *S. fonticola* (Bacillos, 2015, párr. 2 y Stanchi, 2007, pp. 207-208).

Además se caracteriza por no ser exigente nutricionalmente, pues puede encontrarse en el agua potable, cañerías, jabones y antisépticos (Dossi *et al.*, 2002, párr. 2).

Éste género es singular dentro de la familia de enterobacterias por producir 3 enzimas hidrolíticas: lipasa, gelatinasa y DNasa. Crece abundantemente en agar chocolate, agar sangre, y agar Mac Conkey, formando colonias de color rojo gracias al pigmento llamado “prodigiosina” que desprende. Son sensibles a los aminoglucósidos, quinolonas y cefalosporinas de tercera generación (Koneman *et al.*, 2006, p. 255; Patiño, Rodríguez, Alarcon y Abitbol, 2005, pp. 16-17).

Las características bioquímicas más importantes de *Serratia* están expuestas en la Tabla 6.

Tabla 6. Comportamientos bioquímicos más importantes de *Serratia*.

Microorganismo	GEL	LI	OR	SAC	PIG	LDC	MA
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. plymuthica</i>	+	+	-	+	+	+	+
<i>S. rubidaea</i>	+	+	-	+	+	+	-
<i>S. fonticola</i>	-	-	+	+	-	+	-
<i>S. odorifera</i>	+	+	-	+	+	+	+
<i>S. liquefaciens</i>	+	+	+	+	-	+	+

Nota: GEL: hidrólisis de la gelatina; LI: lipasa; OR: ornitina; SAC: fermentación de sacarosa; PIG: pigmento naranja, rojo o amarillo; LDC: descarboxilación y desaminación de la lisina; MA: fermentación de malonato.

Adaptada de Koneman *et al.*, 2006, p. 255.

### 2.3.2.8 *Enterobacter*

Ésta es una bacteria productora de abundante gas que antes era denominada *Aerobacter*, y fue en el año 1960 que Honmaeche y Edwards cambiaron su nombre a *Enterobacter*. Koneman *et al.* (2006, p. 253) apuntan que éste género bacteriano tiene las mismas características que *Klebsiella*, con la única diferencia que *Enterobacter* es móvil.

Están distribuidas naturalmente en el agua, el suelo y las verduras, y forman parte de la flora bacteriana normal en los humanos. Normalmente no ocasionan diarrea, pero existe un cepa (*E. cloacae*) capaz de producir toxinas similares a las que produce el género *Shigella*, produciendo heces pastosas. Causan infecciones en el sistema urinario, respiratorio y tegumentario de forma oportunista, y se han descrito varios casos de meningitis y sepsis (Koneman *et al.*, 2006, p. 253).

Es un bacilo móvil gracias a la presencia de flagelo peritricos, es anaerobio facultativo, no hemolítico y con metabolismo respiratorio y fermentativo. Crece bien en el agar Mac Conkey a 37° C. No son considerados patógenos entéricos (Scanlan, 1991, p.109).

Se muestra el comportamiento bioquímico en la *Tabla 7*.

*Tabla 7*. Resultados de las pruebas bioquímicas más importantes de *Enterobacter*.

Microorganismo	RM	VP	URE	LDC	LAC	SAC	PIG
<i>E. aerogenes</i>	-	+	-	+	+	+	-
<i>E. amnigenus</i>	-	+	-	-	+	+	-
<i>E. absuriae</i>	+	-	-	+	+	+	-
<i>E. cancerogenus</i>	-	+	-	-	-	+	-
<i>E. cloacae</i>	-	+	-	+	+	+	-
<i>E. gergoviae</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. hormaechei</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>E. intermedius</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. kobei</i>	-	+	-	+	+	+	-

Nota: RM: rojo de metilo, VP: Voges-Proskauer; URE: producción de ureasa; LDC: descarboxilación y desaminación de la lisina; LAC: fermentación de lactosa; SAC: fermentación de sacarosa; PIG: pigmento amarillo.

Adaptada de Koneman *et al.*, 2006, p. 253.

### 2.3.2.9 *Citrobacter*

Son patógenos oportunistas de muchas infecciones extraintestinales, por lo tanto, no son denominados patógenos entéricos. Se hallan con mucha frecuencia en el agua, los alimentos, el suelo y el tracto intestinal de animales. Ocasiona infecciones urinarias, de piel, abscesos cerebrales, meningitis y sepsis (Manganello *et al.*, 2001, p. 20 y Scalan, 1991, p. 105).

Es capaz de fermentar el manitol y producir como resultado desprendimiento de gas. Utiliza el citrato como única fuente de carbono y nitrógeno. Se conocen 43 serogrupos "O", basados en antígenos lipopolisacáridos y 20 quimiogrupos, basados en el azúcar que compone los lipopolisacáridos mencionados anteriormente (Public Health Agency of Canada, 2016, párr. 3).

Se transmite por fómites hospitalarios, consumo de alimentos o agua contaminadas con materia fecal, pero la transmisión horizontal de persona a persona es la forma más común de transmisión.

El estudio realizado en el año 2001 por Manganello *et al.* (párr. 25), describió el comportamiento bioquímico de varias especies de *Citrobacter* identificadas a partir de muestras clínicas de pacientes hospitalizados en cuidados intensivos, en Buenos Aires, Argentina. Se describen a continuación en la *Tabla 8*.

*Tabla 8.* Pruebas bioquímicas de especies de *Citrobacter* identificadas en un estudio realizado en Buenos Aires, Argentina.

Microorganismo	IND	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	MO	ONPG	LAC	SAC	NI
<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. koseri</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>C. amalonaticus</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>C. youngai</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. braakii</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>C. werkmanii</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+

Nota: IND: producción de indol; CIT: utilización de citrato; H<sub>2</sub>S: producción de ácido sulfhídrico; URE: producción de ureasa; MO: motilidad; ONPG: actividad de la β-galactosidasa; LAC: fermentación de lactosa; SAC: fermentación de sacarosa; NI: reducción de nitritos a nitratos.

Adaptada de Manganello *et al.*, 2001, párr. 25.

### 2.3.2.10 *Hafnia*

Éste género sólo consta de una especie: *H. alvei*, antiguamente llamada *Enterobacter hafnia*. No tiene importancia clínica en animales ni humanos pues se limita a ser contaminante cervecera. Sin embargo, se han reportado lesiones en la mucosa ciliar del intestino delgado. Se puede aislar de sangre, orina y heces en pacientes asintomáticos (Stanchi, 2007, p. 209).

Las reacciones bioquímicas que produce son similares a las de *Enterobacter*, pero no es capaz de producir ácidos a partir de lactosa, sucrosa, inositol, dulcitol, sorbitol, rafinosa y melobiosa (Stanchi, 2007, p. 209).

### 2.3.2.11 *Providencia*

Provocan infecciones en vías urinarias. Son patógenos extraintestinales oportunistas pero no son capaces de producir enfermedades entéricas en los animales. Se aíslan bien en agares nutritivos como agar sangre y agar Mac Conkey (Koneman *et al.*, 2006. p. 257 y Scanlan, 1991, p. 117).

Las especies que se conocen son *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rustigianii* y *Providencia heimbachae*; las cuales pueden causar enfermedades nosocomiales (Lopardo, Predari y Vay, 2016, pp. 285-287).

La *Tabla 9* expone como Lopardo, Predari y Vay (2016, p. 290) han caracterizado bioquímicamente a las diferentes especies de *Providencia*.

*Tabla 9.* Comportamiento bioquímico de *Providencia*.

Microorganismo	IND	RM	VP	CIT	H <sub>2</sub> S	MOT	LAC	SAC	ONPG
<i>P. stuartii</i>	+	+	-	+	-	+	+/-	+	+/-
<i>P. rettgeri</i>	+	+	-	+	-	+	+/-	+/-	+/-
<i>P. alcalifaciens</i>	+	+	-	+	-	+	-	+/-	+/-
<i>P. rustigianii</i>	+	+	-	+	-	+	-	+/-	-
<i>P. heimbachae</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-

Nota: IND: producción de indol; RM: rojo de metilo; VP: Voges-Proskauer; CIT: utilización del citrato; H<sub>2</sub>S: producción de ácido sulfhídrico; MOT: motilidad; LAC: fermentación de lactosa; SAC: fermentación de sacarosa; ONPG: actividad de la  $\beta$ -galactosidasa; +/-: en bajo porcentaje.

Adaptada de Lopardo, Predari y Vay, 2016, p. 290.

### 2.3.2.12 *Edwardsiella*

Éste género bacteriano tiene importancia clínica veterinaria específicamente en peces, reptiles y anfibios, pero pueden provocar enfermedades entéricas en mamíferos como patógeno oportunista. Puede crecer en agar sangre o agar Mac Conkey (Carter, 1989, p. 173 y Scanlan, 1991, p. 107).

Se conocen 3 especies: *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella hoshinae* y *Edwardsiella ictaluri*. El único género oportunista asociado a infecciones en los seres humanos es *E. tarde*, produciendo en un 50 a 80% gastroenteritis. De forma extraintestinal puede ocasionar meningitis, colecistitis, endocarditis e infección de heridas (Lopardo, Predari y Vay, 2016, pp. 224-226).

La *Tabla 10* muestra los resultados bioquímicos que arroja *Edwardsiella* cuando se quiere identificar en el laboratorio.

*Tabla 10.* Características bioquímicas del género *Edwardsiella* spp..

ONPG	MOT	URE	IND	LIS	ORNI	ARG	GLU	LAC	CIT	RM	VP
- <sup>1</sup>	+ <sup>2,3</sup>	-	+	+	+ <sup>3</sup>	-	+	-	-	+ <sup>3</sup>	-

Nota: ONPG: actividad de la  $\beta$ -galactosidasa; MOT: motilidad; URE: producción de ureasa; IND: producción de indol; LIS: lisina descarboxilasa; ORNI: ornitina descarboxilasa; ARG: arginina dihidrolasa; GLU: fermentación de glucosa; LAC: fermentación de lactosa; CIT: utilización de citrato; RM: rojo de metilo; VP: Voges-Proskauer; <sup>1</sup>: 90% o más de los resultados negativos; <sup>2</sup>: 90% o más de los resultados positivos; <sup>3</sup>: excepto *E. ictaluri*. Adaptada de Lopardo, Predari y Vay, 2016, pp. 227.

## 2.4 Aislamiento e identificación de enterobacterias

### 2.4.1 Actividades bioquímicas de las enterobacterias

Las actividades bioquímicas demuestran el comportamiento metabólico básico que presentan las enterobacterias y por las que son distinguidas de otros microorganismos Gram Negativos. Se mencionan a continuación.

#### **2.4.1.1 Utilización de los hidratos de carbono**

El término que se utiliza para referirse a la utilización de los hidratos de carbono por medio de las bacterias es la “fermentación”, y existen bacterias fermentadoras y no fermentadoras, más comúnmente de la lactosa. La fermentación es un proceso metabólico que sigue la ruta EmbdenMeyerhof o glucólisis a partir de la glucosa y que finaliza en la producción de ácido pirúvico. El ácido pirúvico puede seguir varias rutas de óxido-reducción y carboxilaciones hasta llegar a 4 ácidos generales de la fermentación: 1) ácido acético, 2) ácido fórmico, 3) ácido láctico y 4) ácido succínico. Se produce hidrógeno y CO<sub>2</sub> como producto final de la ruptura del ácido fórmico, mediante la enzima formicohidrogenilasa de algunas bacterianas como *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella* (López, 2011, p. 202 y Koneman *et al.*, 2006, p. 206).

La fermentación es observada mediante cambios de coloración en los indicadores de pH que contienen los medios de cultivos. El cambio de coloración ocurre por la formación de productos ácidos (Koneman *et al.*, 2006, p. 206).

Las enterobacterias utilizan los hidratos de carbono como fuente energética y nutricional para cumplir los requerimientos metabólicos que demanda su crecimiento y multiplicación (López, 2011, p. 203).

#### **2.4.1.2 Actividad de la citocromooxidasa**

Las enterobacterias no presentan actividad citocromooxidasa porque carecen de enzimas oxidasas en su cadena respiratoria. Para realizar ésta prueba existen discos de oxidasa que contienen sustratos que se oxidan en presencia de oxígeno atmosférico y Citocromo C (proteína transportadora de electrones en la cadena de respiración de algunas bacterias) produciendo coloraciones rosadas intensas o fucsias. Como las enterobacterias no poseen ésta enzima-

proteína, no se evidencian cambios de coloración en los discos (Devlin, 2004, p. 573; Koneman *et al.*, 2006, p. 209 y Laboratorios Britania S.A., 2016).

#### **2.4.1.3 Reducción del nitrato a nitrito**

Todas las enterobacterias a excepción de ciertas especies de *Pantoea*, *Serratia* y *Yersinia*, reducen el nitrito a nitrato mediante concentraciones de 0,1% de nitrato de potasio. Ésto ocurre cuando existe respiración anaerobia utilizando el nitrato como aceptor final de electrones mediante la enzima nitrato reductasa y nitrito reductasa (Koneman *et al.*, 2006, p. 209 y Universidad de Granada, 2016).

#### **2.4.2 Medios de cultivos selectivos-diferenciales**

##### **2.4.2.1 Agar Levine ó EMB**

Contiene peptona, lactosa, sacarosa, fosfato dipotásico, agar eosina y azul de metileno, agua destilada con un pH de 7,2 y digerido pancreático de gelatina. Es un medio de cultivo utilizado para el aislamiento de enterobacterias o bacilos Gram Negativos de muestras con contaminación mixta. Los colorantes eosina y azul de metileno inhiben el crecimiento de bacterias Gram Positivas y otras Gram Negativas con requerimientos nutricionales especiales. Las colonias fermentadoras de lactosa muestran una coloración negra-verdosa brillante; en cambio, las fermentadoras lentas o no fermentadoras muestran un color transparente. Existe una modificación en éste medio de cultivo en donde las bacterias no fermentadoras producen colonias violáceas a negras debido a la ausencia de sacarosa, éste medio de cultivo es llamado “fórmula de Holt-Harris y Teague” (Becton Dickinson®, 2013 y Koneman *et al.*, 2006, p. 212).

##### **2.4.2.2 Agar-hierro-triple azúcar o TSI**

Universalmente es empleado para identificar enterobacterias mediante la fermentación de lactosa, glucosa, sacarosa y la producción de ácido sulfhídrico.



Contiene extracto de carne y pluripeptona que aporta nutrientes para el crecimiento y desarrollo bacteriano. Los hidratos de carbonos mencionados son los que se fermentan y el tiosulfato de sodio es el necesario para la producción de ácido sulfhídrico, amonio y sulfato de hierro. Adicionalmente, contiene rojo fenol como indicador de pH y cloruro de sodio para mantener el balance osmótico. La fermentación de los azúcares produce ácidos que se identifican mediante el rojo fenol, que cambia a color amarillo. También se forma sulfuro de hierro que adopta un coloración negra por medio de la reacción del tiosulfato de sodio y una sal de hierro (Laboratorios Britania S.A., 2016).

#### **2.4.2.3 Agar Salmonella-Shigella (SS)**

Como su nombre lo indica, es un medio de cultivo especial para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* mediante la utilización de extracto de carne y peptonas como factores de crecimiento, lactosa como el hidrato de carbono fermentable y mezcla de sales biliares y verde brillante para la inhibición de bacterias bacilares Gram Positivas, bacilos coliformes y *Proteus* spp. (MCD LAB®, 2016).

#### **2.4.2.4 Agar Hektoen**

Los reactivos que posee son: peptona, extracto de levadura, sales biliares, lactosa, sucrosa, salicina, cloruro de sodio, tiosulfato de sodio, citrato amónico férrico, fuscina ácida, azul de timol, agar y agua destilada con un pH de 7,6. Éste medio de cultivo se utiliza para sembrar muestras de materia fecal con la intención de recuperar especies de *Salmonella* y *Shigella*. La presencia de sales biliares inhibe el crecimiento de bacterias Gram Positivas y retarda el de otras coliformes. El metabolismo bacteriano produce ácido por la utilización de los hidratos de carbono y junto con la fuscina ácida y el azul de timol, produce colonias amarillentas (Koneman *et al.*, 2006, p. 213).

La peptona y el extracto de levadura son los nutrientes que hacen posible el crecimiento microbiano. La lactosa, silicina y sacarosa, pertenecen al grupo de los hidratos de carbono fermentables y el azul de timol junto con la fuscina ácida, son los indicadores de ésa fermentación. El citrato de hierro es el indicador de la formación de ácido sulfhídrico (Laboratorios Britania S.A., 2016).

#### **2.4.2.5 Agar Mac Conkey**

Es uno de los medios de cultivos selectivos diferenciales más utilizados para la recuperación de enterobacterias y otras Gram Negativas entéricas. La combinación de peptona, polipeptona, lactosa, agua destilada con un pH de 7,1, rojo neutro, agar y cloruro de sodio, le confieren los requerimientos nutricionales para el crecimiento y la multiplicación de éstas bacterias. También contiene sales biliares y violeta de genciana que inhiben el crecimiento de las bacterias Gram Positivas (Koneman *et al.*, 2006, p. 212).

La lactosa es la única fuente de hidratos de carbono que contiene, y cuando existe crecimiento de colonias bacterianas fermentadoras de lactosa, produce coloración rosada-rojiza por la transformación del colorante rojo neutro a partir de la producción de ácidos mixtos. En cambio, las colonias que no fermentan la lactosa se muestran de un color amarillento-transparente (Koneman *et al.*, 2006, p. 212).

### **2.5 Pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de enterobacterias**

#### **2.5.1 Producción de Indol**

Las enterobacterias tienen la capacidad de utilizar el triptófano por medio de la enzima triptofanasa y producir indol, amoníaco y ácido pirúvico. El medio de cultivo se observa de coloración rojiza después de agregar una solución que contiene p-dimetilaminobenzaldehído, comúnmente llamado reactivo de Kovac.

Éste detecta la liberación de indol mediante la degradación del aminoácido triptófano (Fernández *et al.*, 2016 y Koneman *et al.*, 2006, p. 216).

### **2.5.2 Prueba del rojo de metilo**

Demuestra el comportamiento de los microorganismos a partir del piruvato que se forma en la fermentación de la glucosa. Las bacterias que siguen la ruta EmbdenMeyerhof de fermentación ácida de la glucosa, mantienen el pH por debajo de 4,4, el indicador estándar del rojo de metilo, es así, como el rojo de metilo identifica a especies bacterianas productoras de ácidos fuertes a partir de la glucosa (Koneman *et al.*, 2006, p. 217). MacFaddin (2003, p. 301) apunta que se trata de una prueba cuantitativa para la determinación del pH, ya que algunos microorganismos producen más ácidos que otros.

### **2.5.3 Prueba de Voges-Proskauer**

Indica la presencia de un producto final neutro llamado acetil-metilcarbinol a partir de la fermentación de la glucosa. Voges y Proskauer fueron los primeros bacteriólogos en descubrir la coloración rojiza que ésta prueba muestra en presencia de hidróxido de potasio (MacFaddin, 2003, p. 411). Koneman en el año 2006 (p. 217) señaló que ésta prueba también tiene como objetivo identificar la conversión de la acetoína o acetil-metilcarbinol en diacetilo por medio del oxígeno atmosférico y el hidróxido de sodio. Por otro lado, Fernández *et al.* (2016), apuntaron que se realiza para determinar la utilización de glucosa por parte de las bacterias, y que cuando los microorganismos utilizan la glucosa, se forma acetoína que ocasiona una coloración rojiza.

### **2.5.4 Utilización de citrato**

Indica la utilización de citrato como única fuente de carbono y nitrógeno. Produce alcalinidad en el medio y turbidez cuando el microorganismo es capaz de utilizarlo para su metabolismo y como factor de crecimiento. El componente

activo generalmente es el citrato trisódico (bioMérieux SA, 2016; Fernández, García, Sáez y Valdezate, 2016 y Koneman *et al.*, 2006, p. 217).

### **2.5.5 Producción de ureasa**

Fernández *et al.* (2016), MacFaddin (2003, p. 397) y Koneman *et al.* (2006, p. 218), apuntan que ésta prueba determina la capacidad de un microorganismo de desdoblar la urea en dos moléculas de amonio mediante la enzima ureasa.

### **2.5.6 Descarboxilación de lisina, ornitina y arginina**

La reacción de ésta prueba se mide mediante la producción de cambios en el pH del medio, por la acción de los ácidos resultantes de la fermentación de la glucosa. Las enterobacterias tienen enzimas que descarboxilan aminoácidos mediante enzimas descarboxilasas que eliminan una molécula de CO<sub>2</sub> de cada aminoácido para formar aminas. Los aminoácidos son la lisina, la ornitina y la arginina, que a su vez producen cadaverina, putrescina y citrulina respectivamente (Koneman *et al.*, 2006, p. 218).

### **2.5.7 Producción de fenilalanina desaminasa**

MacFaddin en el año 2003 (p. 362) apuntó que ésta prueba es útil para "Determina la capacidad de un microorganismo para desaminar la fenilalanina a ácido fenilpirúvico por vía enzimática, con la producción de acidez.". Además recalca que también se utiliza en el estudio de las enterobacterias para separar a los género *Morganella*, *Proteus* y *Providencia* de los otros aislados con mayor frecuencia. Se utiliza el extracto de levadura como fuente de carbono y nitrógeno (Koneman *et al.*, 2006. p. 219).

### **2.5.8 Producción de sulfuro de hidrógeno**

Es producido por bacterias reductoras de sulfato (SO<sub>4</sub>) en un ambiente anaerobio. Ésta prueba determina la liberación de azufre de los aminoácidos,

mediante un precipitado negro o emblanqueamiento de tiras de papel filtro en la línea de inoculación, en el fondo del medio o en los centros de las colonias aisladas. El tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) es la principal fuente de azufre en los medios utilizados para la producción de ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (Koneman *et al.*, 2005, p. 219, 2008, p. 213 y Recinto Universitario de Mayagüez, 2016, p. 2).

### **2.5.9 Prueba de oxidasa**

Se realiza para detectar la presencia de enzimas oxidasas por medio de la citocromooxidasa, la cual produce oxidación del citocromo, que es reducido por oxígeno molecular. El resultado produce agua o agua oxigenada. Todas las enterobacterias son oxidasas negativas excepto *Plesiomonas shigelloides* (Fernández *et al.*, 2016 y MacFaddin, 2003, p. 344).

### **2.5.10 Motilidad**

Como su nombre lo indica, determina si un microorganismo en particular es móvil o inmóvil. Se mide mediante la formación de turbidez desde la línea de siembra en los medios de cultivo semisólidos. Ésta es una prueba esencial para la determinación final de una especie bacteriana (Koneman *et al.*, 2006, p. 220 y MacFaddin, 2003, p. 309).

## **2.6 API® 20 E: prueba rápida para la identificación de enterobacterias**

### **2.6.1 Definición**

El test API® es un sistema estandarizado de multipuebas bioquímicas que garantiza la identificación microbiana de manera rápida y confiable. Dentro de la gama de productos API® se encuentra el 20 E, el cual permite la identificación de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram Negativos no exigentes. El test consta de 21 pruebas bioquímicas miniaturizadas en una tira reactiva que posee 20 microtubos con sustratos deshidratados, así cada tubo es una prueba bioquímica diferente. La prueba

número 21 se hace independientemente a la tira, y corresponde a la prueba de oxidasa (bioMérieux SA, 2016 y Domínguez, 2012).

El fundamento se basa en los cambios de coloración de los microtubos de manera espontánea o por la adición de reactivos, producto de las reacciones bioquímicas que generan las bacterias suspendidas en solución de Cloruro de Sodio estéril al 0.85 % dentro de los microtubos (bioMérieux SA, 2016).

La lectura de las reacciones resultantes se realiza mediante la Tabla de Lectura que incluye el test (ver *Tabla 11*) y la identificación, con el software de identificación API® web (bioMérieux SA, 2016).

*Tabla 11.* Tabla de lectura según la coloración de los pocillos de la galería API® 20 E.

Test	Resultado	
	Negativo	Positivo
ONPG	Incoloro	Amarillo
ADH	Amarillo	Rojo - anaranjado
LDC	Amarillo	Rojo - anaranjado
ODC	Amarillo	Rojo - anaranjado
CIT	Verde pálido-amarillo	Azul-verde - azul
H <sub>2</sub> S	Incoloro	Depósito negro
URE	Amarillo	Rojo - anaranjado
TDA	Amarillo	Marrón-rojizo.
IND	Incoloro - verde pálido-amarillo	Rosa
VP	Rosa - pálido	Rosa - rojo
GEL	No difusión	Difusión pigmento negro
GLU	Azul - azul verdoso	Amarillo - amarillo grisáceo
MAN	Azul - azul verdoso	Amarillo
INO	Azul - azul verdoso	Amarillo
SOR	Azul - azul verdoso	Amarillo
RHA	Azul - azul verdoso	Amarillo
SAC	Azul - azul verdoso	Amarillo
MEL	Azul - azul verdoso	Amarillo
AMY	Azul - azul verdoso	Amarillo
ARA	Azul - azul verdoso	Amarillo

Nota: ONPG: actividad de la  $\beta$ -galactosidasa; ADH: utilización de arginina; LDC: descarboxilación y desaminación de la lisina; ODC: descarboxilación de ornitina; CIT: utilización de citrato; H<sub>2</sub>S: producción de ácido sulfhídrico; URE: producción de ureasa; TDA: detecta la presencia de triptófano desaminasa; IND: producción de indol; VP: Voges-Proskauer; GEL: hidrólisis de la gelatina; GLU: fermentación de la glucosa; MAN: fermentación del manitol; INO: fermentación del inositol; SOR: fermentación del sorbitol; RHA: identificación de ramnosa; SAC: fermentación de la sacarosa; MEL: fermentación de la melobiosa; AMY: fermentación de amígdalina; ARA: fermentación-oxidación de L-arabinosa.

Adaptada de bioMérieux SA, 2016.

### 2.6.2 Pruebas bioquímicas que realiza el test

Además de las pruebas bioquímicas tradicionales que se realizan comúnmente para identificar enterobacterias (ver literal 4.3), el test API® 20 E incluye las siguientes pruebas adicionales:

- Prueba ONPG: el componente activo es el 2-nitro-fenil- $\beta$ D-galactopiranosida, y se trata de un sustrato artificial utilizado para la detección de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa. Cuando esta enzima está presente, se hidroliza la molécula de ONPG en galactosa y orto-nitrofenol, vehículo indispensable de las enterobacterias para la utilización de la lactosa (bioMérieux SA, 2016).
- Prueba ADH: el objetivo de ésta prueba es comprobar si las bacterias utilizan la arginina como fuente de carbono y energía para su crecimiento, por medio de la enzima Arginina-dihidrolasa (McMurry University, 2014).
- Prueba LDC: la prueba se basa en la descarboxilación y desaminación de la lisina (un aminoácido) y en la producción de ácido sulfhídrico, por medio de la enzima Lisina-descarboxilasa (Laboratorios Britania S.A., 2016).
- Prueba TDA: detecta la presencia de triptófano desaminasa mediante el triptófano como sustrato, un aminoácido de las proteínas (Sharlab®, 2016).
- Prueba GEL: llamada prueba de hidrólisis de la gelatina, indica la capacidad de las bacterias de hidrolizar la gelatina a aminoácidos y péptidos por medio de las enzimas gelatinasas (bioMérieux SA, 2016).
- Prueba MAN: detecta si el microorganismo es capaz de fermentar el manitol y liberar productos ácidos detectados por el rojo de metilo (bioMérieux SA, 2016).
- Prueba INO: demuestra si existe fermentación de inositol, un sustrato orgánico no perteneciente a los hidratos de carbono (MacFaddin, 2003, p. 58).

- Prueba SOR: determina la fermentación de sorbitol, un azúcar que utilizan las bacterias para obtener energía y hacer posible todos sus procesos metabólicos (bioMérieux, 2016 y Stanier, Ingraham, Wheelis y Painter, 2005, p. 533).
- Prueba RHA: prueba que identifica la ramnosa, un hidrato de carbono proveniente de la manosa que es utilizado por algunas enterobacterias para producir energía (MacFaddin, 2003, p. 54).
- Prueba SAC: identifica la fermentación de la sacarosa en glucosa y fructosa. Se incluye dentro de los hidratos de carbono que utilizan algunas enterobacterias para sus procesos metabólicos (MacFaddin, 2003, p. 54).
- PRUEBA MEL: determina la fermentación de la melobiosa, otro hidrato de carbono utilizado por algunas enterobacterias para la producción de energía (MacFaddin, 2003, p. 54).
- PRUEBA AMY: demuestra si existe fermentación de la amigdalina, un azúcar compuesto por 2 moléculas de glucosa, 1 de benzaldehído y otra de cianuro. Las bacterias que pueden fermentar la amigdalina la utilizan como vitamina para su crecimiento y multiplicación (MacFaddin, 2003, p. 54).
- PRUEBA ARA: prueba que contiene L-arabinosa. Detecta si el organismo que se quiere identificar tiene la capacidad de fermentar y/o oxidar éste hidrato de carbono, para utilizarlo como fuente nutritiva en su metabolismo (bioMérieux Sa, 2016; DIBICO S.A. y MacFaddin, 2003, p. 555).

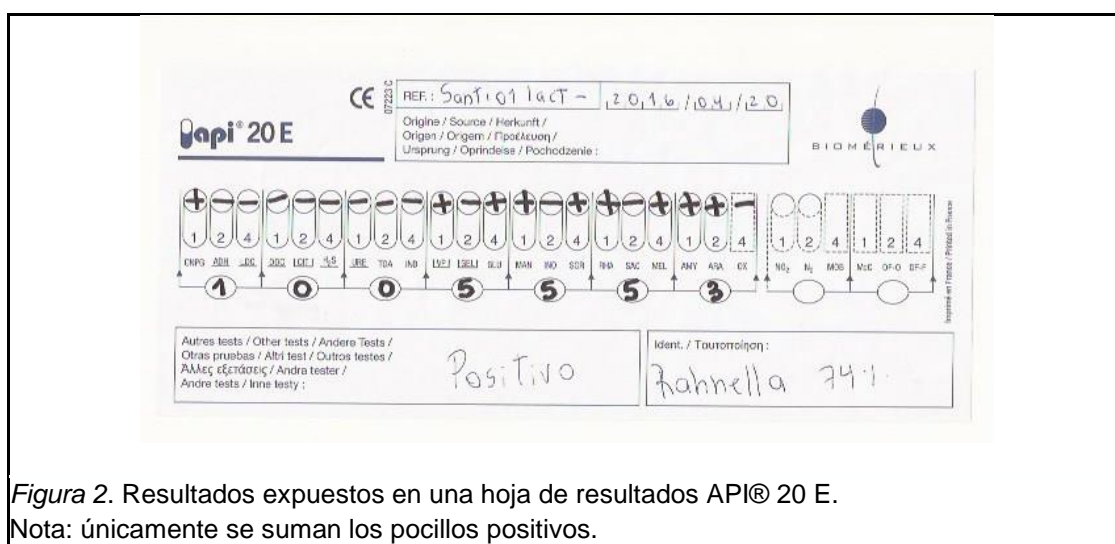
### **2.6.3 Lectura e interpretación de los resultados**

Mediante la plataforma en internet que incluye el producto se realiza la interpretación de los resultados, basado en la suma de dígitos obtenidos por los cambios de coloración de los pocillos de la tira reactiva, resultantes del



metabolismo bacteriano (bioMérieux, 2016). Los pocillos están separados por grupos de 3 y se les llama tripletes.

De todas las reacciones se obtiene un número de 7 cifras, compuesto por la sumatoria de cada grupo de pocillos positivos. Para obtener el número de 7 cifras, se asignan valores de 0 cuando la reacción es negativa, 1 cuando la reacción del primer pocillo de un triplete es positiva, 2 cuando es positivo el segundo pocillo, y 4 cuando es positivo el tercero. Se suman los valores de los 7 tripletes por separado y de ésta manera se obtiene un número de 7 cifras (Domínguez, 2012) como muestra la *Figura 2*.



Finalmente se coloca el mismo número o código de 7 cifras en el software API® 20 E y éste arrojará la identificación bacteriana. Cada identificación refleja el porcentaje de fiabilidad, porcentaje de identificación, índice de tipicidad, especie propuesta, un perfil bioquímico completo y recomendaciones para tests complementarios (bioMérieux SA, 2016 y Domínguez, 2012).

## CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Ubicación geográfica y urbana

La investigación de campo y recolección de las muestras se llevó a cabo en distintas zonas del sur del Distrito Metropolitano de Quito: Barrio El Pintado, Mercado Mayorista, Sector Chiriyacu, Sector Terminal de Quitumbe, Sector La Mena, Av. Mariscal Sucre y Santiago, Tribuna del Sur, Sector La Jota, Sector Moraspungo, Calle Rafael Arteta y Calvas, Escuela Fe y Alegría, Av. Teniente Hugo Ortiz y Calle Agustín Aguinaga. Las zonas de recolección se evaluaron antes del inicio de la investigación, con la finalidad de abarcar todos los puntos conocidos de venta ambulante de leche cruda de cabras en el sur de Quito (ver *Figura 3*)



Figura 3. Ubicación de las zonas de recolección de las muestras de leche cruda de cabras en el sur de la ciudad de Quito.  
Nota: cada punto de color rojo corresponde a una zona de muestreo.

El sur de la ciudad de Quito cuenta con una temperatura media anual que oscila entre 13,9 a 22° C, una precipitación de 1.273 milímetros al año (mm/año) y una altitud de 2.200 a 3.100 metros sobre el nivel del mar (msnm) (es-climate-data.org, 2015).

Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador, el mismo en donde se obtuvieron también los resultados finales de la investigación.

### **3.2 Diseño del estudio**

Fue un estudio descriptivo sincrónico de corte transeccional entre las fechas 04 al 27 de abril del 2016, que consistió en identificar coliformes 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 Quito. Las muestras fueron tomadas directamente del vaso o bolsa plástica en las que se vende normalmente la leche, con la finalidad de obtener resultados certeros de la condición higiénica de la leche cuando es consumida.

Se tomaron todas las muestras de leche posible, de forma aleatoria, en distintas zonas del sur de Quito:

- 1) Barrio El Pintado: Av. Mariscal Sucre e Ilesca, Av. Mariscal Sucre y Alonso de Angulo y Av. Mariscal Sucre y Av. Michelena, 6 muestras.
- 2) Sector Chiriyacu: Av. Gualberto Pérez y Alamour, 7 muestras.
- 3) Mercado Mayorista: Calle Ayapamba, 10 muestras.
- 4) Sector Terminal de Quitumbe: Calle Quitumbe Ñam, 8 muestras.
- 5) Sector La Mena: Av. Mariscal Sucre y Hernán Gmoiner, 9 muestras.

- 6) Av. Mariscal Sucre y Santiago, 7 muestras.
- 7) Tribuna del Sur, 7 muestras.
- 8) Sector la Jota: Av. Solanda, 6 muestras.
- 9) Sector Moraspungo, 5 muestras.
- 10) Calle Rafael Arteta y Calvas, 7 muestras.
- 11) Escuela Fe y Alegría, 8 muestras.
- 12) Av. Teniente Hugo Ortíz- puente desnivel, 8 muestras.
- 13) Calle Agustín Aguinaga, 6 muestras.

En total se logró tomar 94 muestras de leche de todos los animales caprinos hembras que se encontraban a orillas de las calles, dispuestas a ser ordeñadas por sus propietarios, al momento que los consumidores deseaban comprar el producto. Por lo tanto, no se tomaron en cuenta factores de inclusión y exclusión, ya que la leche es expandida libremente de cualquier animal disponible sin importar sus características.

Posteriormente, las muestras se analizaron en el Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador.

Con el objetivo de obtener más información acerca de la situación del expendio y consumo de leche cruda de cabras, se realizaron 2 cuestionarios de encuestas, uno dirigido a los propietarios-productores de todos los animales muestreados (27 encuestas: ver Anexo 1) y otra, a algunos de los transeúntes de las zonas de recolección, que forman parte de la población en riesgo a

enfermarse por ETA's (40 encuestas: ver Anexo 2). Los cuestionarios arrojaron información importante de la cantidad de leche expendida al día por cada productor y por lo tanto, de la cantidad de personas expuestas posiblemente a ETA's por consumir éste producto; además se infirió qué tan común es el consumo de ésta leche en el sur de la ciudad de Quito.

Los resultados microbiológicos y los datos obtenidos de las encuestas se tabularon en el programa Microsoft Excel® y posteriormente, se realizaron cálculos de intervalos de confianza de Pearson con el 95% de confiabilidad, para la variable en estudio.

### **3.3 Materiales y métodos**

#### **3.3.1 Materiales**

##### **3.3.1.1 Materiales utilizados en el trabajo de campo**

- Envases de recolección estériles de 100 ml para muestras de orina.
- Caba pequeña de plástico.
- 2 bolsas de hielo en gel.
- Marcador negro permanente marca Sharpie®.
- 1 caja talla S de guantes de látex de examinación.
- Encuestas para los productores de la zona.
- Encuestas para los posibles consumidores de la leche cruda.
- Lapicero.
- Cuaderno de anotaciones
- Cámara fotográfica.

##### **3.3.1.2 Materiales utilizados para el análisis de las muestras**

- Agua destilada.
- Papel empaque.
- Autoclave.

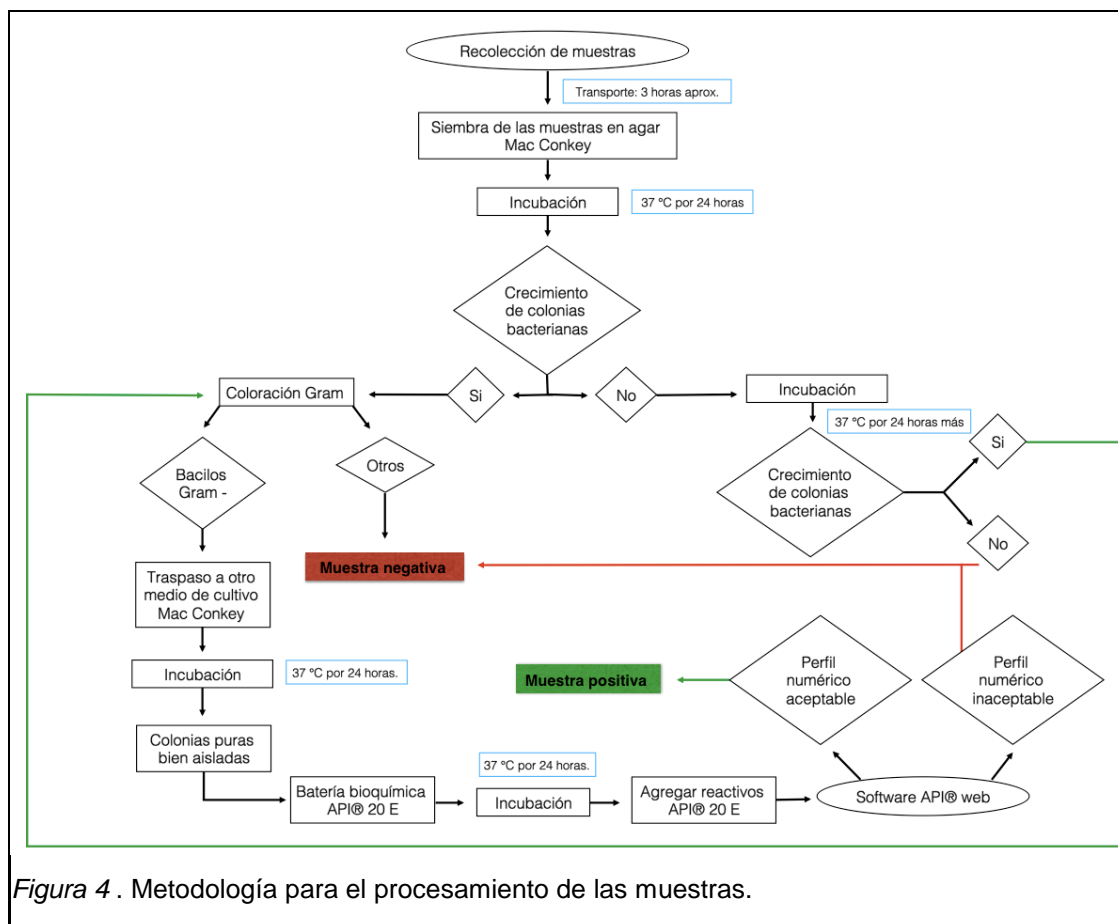
- Cajas de petri de vidrio con tapa.
- Guantes de protección para el calor.
- Guantes de látex de examinación.
- Bata blanca de laboratorio.
- Mesa de trabajo.
- Matraces Erlenmeyer de 50, 100 y 200 ml.
- Agar Mac Conkey Difco™.
- Espátula de metal.
- Probeta de 200 ml.
- Balanza digital BOECO.
- Papel encerado.
- Papel aluminio.
- Estufa de gas.
- Yesquero.
- Marcador negro permanente marca Sharpie®.
- Máquina de bioseguridad o Filtro APA.
- Vaso de precipitación de vidrio de 1000 ml.
- Mechero de gas.
- Recipiente de vidrio para desechos contaminados.
- Asas de vidrio Digralsky.
- Alcohol al 75%.
- Muestras de leche.
- Vortex GENIE.
- Micropipeta.
- Puntas de plástico desechables y estériles para micropipeta.
- Incubadora.
- Cuaderno de anotaciones.
- Lapicero.
- Cámara fotográfica.
- Placas portaobjetos.
- Torundas de algodón.
- Papel desechable de limpieza.

- Palillos de madera estériles.
- Cristal violeta.
- Yodo.
- Alcohol cetona.
- Safranina.
- Microscopio.
- Aceite de inmersión.
- Cámara de incubación API® 20 E.
- Gradilla de metal.
- Alcohol isopropílico.
- Jeringas estériles de 5 ml.
- Gotero de vidrio.
- Asa bacteriológica de platino.
- Solución al 0,85% de Cloruro de Sodio estéril.
- Discos de oxidasa.
- Bolsas de hielo en gel.
- Pinza anatómica de metal.
- Tiras reactivas API® 20 E.
- Reactivos del test API® 20 E: reactivo de JAMES, TDA, VP1 y VP2.
- Aceite mineral.
- Hojas de anotaciones de resultados API® 20 E.
- Instrucciones de la prueba API® 20 E.
- Software API® web.
- 

### **3.3.2 Métodos**

Se expone la *Figura 4* que resume la metodología efectuada en la presente investigación.





### 3.3.2.1 Toma de las muestras

La metodología considerada fue la del “Manual de Toma de Muestras y Procedimientos del Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador” (2006), descrito por la Dra. María Belén Cevallos, directora del laboratorio. Adicionalmente, se tomaron en cuenta algunas recomendaciones del “Manual de Procedimientos para la Toma y Envío de muestras al laboratorio” del Laboratorio de Diagnóstico LIVEXLAB® (2016).

La recolección de las muestras se efectuó los días lunes, martes y miércoles desde las 6:00 hasta las 9:00 horas entre el 04 y el 27 de Abril del 2016. Se escogieron los días mencionados, para que fuese posible el manejo y procesamiento de las muestras dentro del laboratorio, ya que se requería un

mínimo de 72 horas post muestreo para obtener los resultados finales (ver *Figura 4*).

La venta de la leche por parte de los productores empezaba normalmente a partir de las 6:30 horas, así que se decidió llegar a los lugares de expendio con 30 minutos de anticipación, con el objetivo de garantizar la recolección de muestras pertenecientes al estadio medio del ordeño. De esta manera, se evitó recolectar muestras de la primera y última fase del ordeño, las cuales podían incluir contaminación bacteriana secundaria o al contrario, encontrarse muy diluidas y sin la cantidad normal de algunos componentes de la leche como la grasa.

Las muestras se obtuvieron directamente de los vasos o bolsas plásticas donde se expende normalmente el producto, con la finalidad de obtener resultados certeros de la condición higiénica de la leche cuando es consumida. Una vez obtenidas las muestras, se destaparon los recipientes estériles manteniendo las tapas boca arriba para evitar contaminación secundaria, y se procedió a trasvasar la leche con las manos enguantadas. Éstos se cerraron y rotularon con una codificación preestablecida, que incluyó las iniciales del lugar de recolección de las muestras, seguido por el número resultante de la cantidad de muestras recolectadas en una misma zona. Por ejemplo, la octava muestra recolectada en el Mercado Mayorista fue codificada como “Me08” (ver *Figura 5* y *Anexo 7*).



*Figura 5.* Codificación de la muestra número 8 recolectada en el sector Mercado Mayorista.

Los recipientes con las muestras se guardaron en la caba de plástico que contenía 2 bolsas de hielo en gel, una se dispuso en el fondo de la caba y la otra encima de las muestras con el objetivo de mantenerlas frías durante el transporte hacia el laboratorio.

Los cuestionarios de las encuestas tanto para los productores como para algunos de los posibles consumidores, se realizaron de manera anónima y aleatoria contemplando todas las zonas de recolección. Se entrevistaron a la totalidad de los productores (27) de los animales muestreados y a 40 de los transeúntes que frecuentaban las zonas de muestreo, los cuales formaban parte de la población en riesgo a contraer ETA's al momento de consumir el producto.

### **3.3.2.2 Análisis de las muestras en el laboratorio**

Los procedimientos que se llevaron a cabo dentro del laboratorio para la siembra y el aislamiento de enterobacterias fueron los descritos por la Dra. Maria Belén Cevallos, directora del Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador, protocolo modificado de Koneman *et al.* (2006).

Para la identificación de las enterobacterias aisladas, se siguieron las instrucciones del inserto (manual adjunto) del test API® 20 E establecidas por la casa comercial bioMérieux SA (2016).

#### **3.3.2.2.1 Esterilización de las cajas de petri**

Se envolvieron en papel empaque y se introdujeron en el autoclave, el mismo que alcanza una temperatura de 121° C y 15 libras de presión o psi en 10 minutos y se mantiene en esas condiciones durante 15 minutos.

### **3.3.2.2.2 Preparación del medio de cultivo**

El medio de cultivo se preparó siguiendo las indicaciones del fabricante Difco™ (50 gramos del polvo Mac Conkey para preparar 1 litro de solución), se esterilizó en el autoclave y se dispensó dentro del filtro APA o cámara de bioseguridad con el flujo de aire encendido en cajas de petri esterilizadas. Los medios de cultivos se prepararon y dispensaron con 24 horas de anticipación y se almacenaron en la nevera a 4° C aproximadamente.

### **3.3.2.2.3 Siembra de las muestras**

Se agregó 50 ml de alcohol al 75% dentro del vaso de precipitación de 1000 ml, se sumergió dentro de él el asa de vidrio Digralsky y se dejó desinfectando. Mientras tanto, se colocó el mechero de gas cerca de todos los materiales de trabajo y se prendió. Se encendió el vortex GENIE y se configuró a una velocidad de 500 revoluciones por minuto (rpm) y se ajustó la micropipeta a un volumen de 300 microlitros. Por otro lado, se sacaron los medios de cultivo de la nevera y se dejaron destapados dentro del filtro APA con el flujo de aire encendido durante 10 minutos con la intención de secar la humedad que produce la nevera.

Transcurridos los 10 minutos, se verificó que los medios de cultivo estuvieran secos, se taparon y colocaron encima de la mesa de trabajo y cerca del mechero de gas. Para empezar la siembra, se sacó una de las muestras de la caba de plástico y se homogeneizó en el vortex GENIE durante 10 segundos. Mientras se cumplía el tiempo de homogeneización, se rotuló la base de la caja de petri con el código de la muestra y se preparó la micropipeta colocando las puntas de plástico en su extremo inferior sin tocar la parte estéril. Después, sin soltar la micropipeta, se tomó con la mano desocupada el recipiente con la muestra homogeneizada, se colocó cerca del mechero de gas, se destapó y se extrajo parte de la muestra presionando hasta el primer tope el pulsador de pipeteado. Inmediatamente, se abrió con la mano desocupada la caja de petri,

se depositó con la micropipeta la muestra de leche extraída presionando hasta el segundo tope, se cerró la caja de petri, se desechó la punta de plástico de la micropipeta en el recipiente de vidrio exclusivo para los desechos contaminados, se apartó la caja de petri del mechero de gas y se dejó reposando mientras se realizaba el mismo procedimiento con las demás muestras.

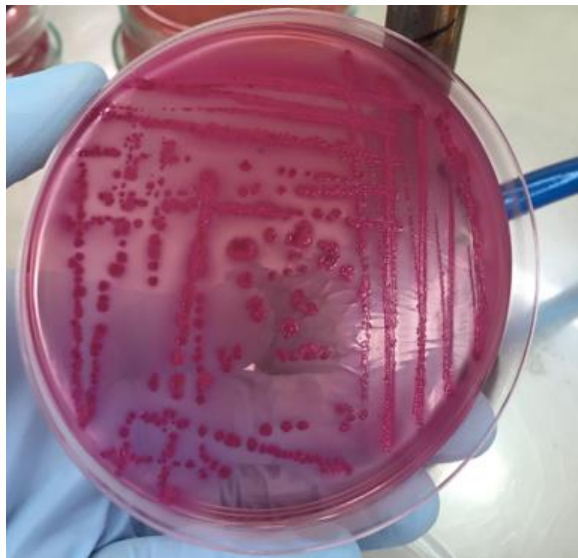
Una vez agregados los 300 microlitros de cada muestra en los medios de cultivo, se sacó el asa Digralsky del alcohol al 75%, se esterilizó con el mechero de gas durante 5 segundos y se dejó enfriar durante 5 segundos más cerca del mechero y sobre el borde del vaso de precipitación que contenía el alcohol. Durante el enfriamiento del asa, se tomó una de las cajas de petri, se colocó cerca del mechero de gas y se destapó. Después se tomó el asa y se comenzó a esparcir la muestra desde el centro y por toda la caja de petri. Por último, se cerró la caja de petri, se sumergió nuevamente el asa dentro del alcohol y se repitió el mismo procedimiento con las demás cajas de petri.

Para finalizar, se trasladaron las cajas de petri con las siembras correspondientes a la incubadora que mantenía una temperatura de 37° C. Las cajas de petri se ubicaron con la tapa hacia arriba y la base hacia abajo para evitar el derrame de las muestras, y después de 15 minutos, cuando las siembras estuvieron fijadas en el medio de cultivo, se voltearon todas las cajas de petri, quedando la base hacia arriba y las tapas hacia abajo. Se dejó incubando durante 24 horas y se anotó en el cuaderno de anotaciones la fecha de siembra de cada muestra por separado.

#### **3.3.2.2.4 Lectura de los resultados**

Primero se realizó la lectura macroscópica de las muestras sembradas en las cajas de petri colocándolas sobre la mesa de trabajo junto al mechero de gas encendido. Se observó minuciosamente toda el área de siembra con el objetivo de visualizar si hubo crecimiento bacteriano, y en caso de que existiera,

identificar si las colonias bacterianas aisladas eran fermentadoras de lactosa (colonias de color fucsia brillante) o no fermentadoras de lactosa (colonias amarillas pálidas o transparentes). A continuación, la *Figura 6* muestra cómo se observaron las colonias lactosa positiva, y la *Figura 7*, las colonias lactosa negativa.



*Figura 6.* Colonias bacterianas lactosa positiva.



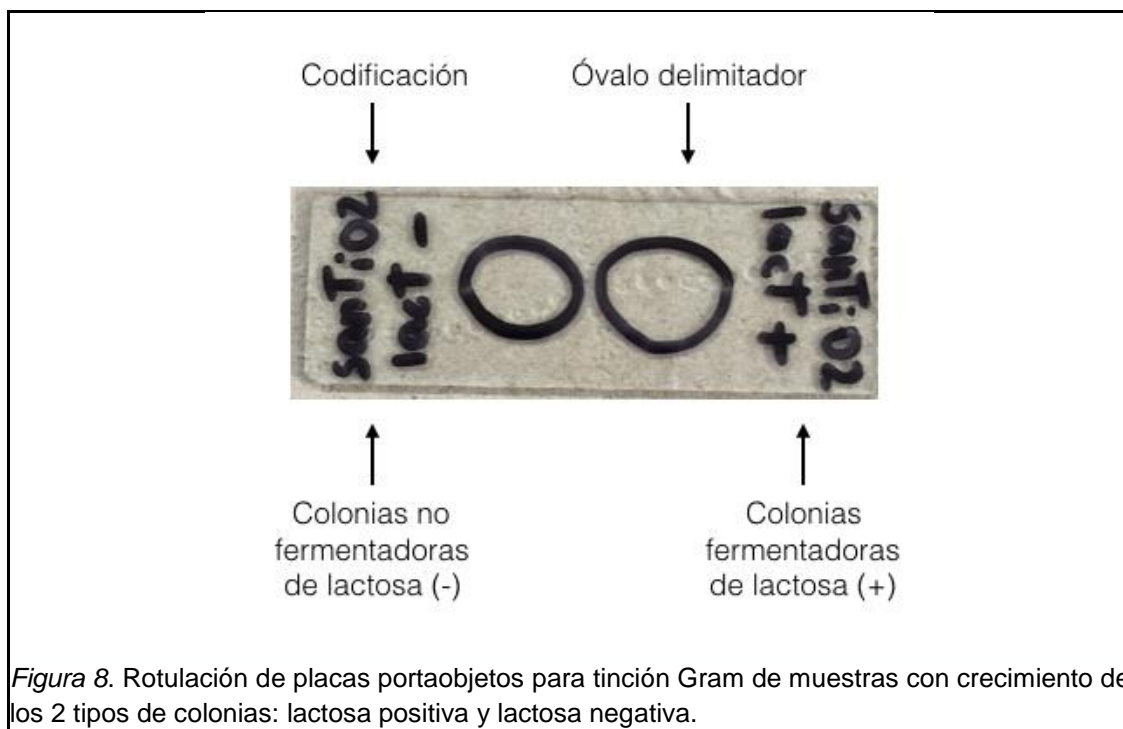
*Figura 7.* Colonias bacterianas lactosa negativa.

Se registró en el cuaderno de anotaciones aquellas muestras que presentaron crecimiento bacteriano positivo y por separado, las que no presentaron crecimiento.

Las muestras sin crecimiento se dejaron incubando por 24 horas más, y transcurrido ese tiempo, se volvieron a leer. Las que permanecieron sin crecimiento bacteriano se consideraron muestras negativas.

A las muestras positivas se les realizó tinción Gram y se leyeron microscópicamente. Las placas portaobjetos con el extendido bacteriano que se utilizaron para la coloración Gram se rotularon de la siguiente manera:

- Para las muestras con crecimiento bacteriano de sólo un tipo de colonia (lactosa positiva o lactosa negativa): se rotuló con el marcador negro permanente uno de los 2 extremos de la placa portaobjetos con la misma codificación que la caja de petri que contenía la muestra macroscópicamente positiva e inmediatamente debajo de la codificación, se dibujó un ovalo que sirvió como espacio para la delimitación del extendido bacteriano.
- Para las muestras con crecimiento bacteriano de los 2 tipos de colonias (lactosa positiva y lactosa negativa): se les realizó doble rotulación. La primera rotulación en un extremo de la placa, con el código de la muestra correspondiente seguido de las letras "lact" más el símbolo "+", para las colonias fermentadoras de lactosa. Y La segunda rotulación, en el otro extremo con el mismo código seguido de las letras "lact" más el símbolo "-", para las colonias no fermentadoras de lactosa. También se les dibujó el óvalo debajo de cada rotulación que ayudó a delimitar el extendido bacteriano. Éstas placas quedaron con 2 rotulaciones y 2 óvalos. Para mejor entendimiento se expone la *Figura 8*.



Luego de la tinción Gram, se colocaron las placas portaobjetos con la muestra bacteriana sobre la platina y entre las pinzas del microscopio y se observó con el lente 100x. Se ajustó con el micrométrico y el macrométrico hasta que se obtuvo una imagen nítida. Con las perillas coaxiales de movimiento x-y de la platina, se visualizó completamente la placa portaobjetos y se determinó la presencia de bacilos Gram Negativos, que indicó la posible presencia de enterobacterias. Los extendidos bacterianos que reflejaron bacterias con las características descritas anteriormente fueron consideradas muestras microscópicamente positivas.

Seguidamente, a las muestras microscópicamente positivas, se les realizó la prueba de oxidasa de la siguiente manera:

- Se extrajo de la nevera el recipiente de vidrio que contenía discos de oxidasa y se llevó a la mesa de trabajo junto a una bolsa de hielo en gel. También se tomó una placa portaobjetos y un recipiente con palillos de madera estériles.



- Con una pinza anatómica previamente flameada con el mechero de gas y enfriada, se extrajo un disco de oxidasa y se colocó encima de la placa portaobjetos. Se tomó la caja de petri correspondiente con las colonias bacterianas aisladas y se extrajo una pequeña cantidad de colonia con el palillo de madera estéril y ésta se frotó encima del disco. Cuando no se evidenció cambio en la coloración del disco, la prueba se consideró negativa a oxidasa y positiva a la posible presencia de enterobacterias; y cuando se evidenció cambio de coloración del disco, la prueba se consideró positiva a oxidasa y negativa a la posible presencia de enterobacterias.

Para la lectura se tomó en cuenta que las colonias bacterianas que crecen en agar Mac Conkey adoptan una coloración rosácea resultante de los ingredientes que compone el medio, por lo tanto, siempre existirá leve cambio de coloración en los discos que no es indicativo de una prueba positiva a oxidasa (ver *Figura 9*). Por esto, para facilitar la lectura y evitar falsos positivos, se realizó por separado la prueba de oxidasa a una bacteria del cepario del laboratorio que se sabía era oxidasa positiva (*Pseudomona* spp.) y se realizaron comparaciones de las coloraciones (ver *Figura 10*).



*Figura 9.* Prueba de oxidasa negativa.

Nota: véase el leve cambio de coloración del disco resultante de los componentes del medio de cultivo Mac Conkey.

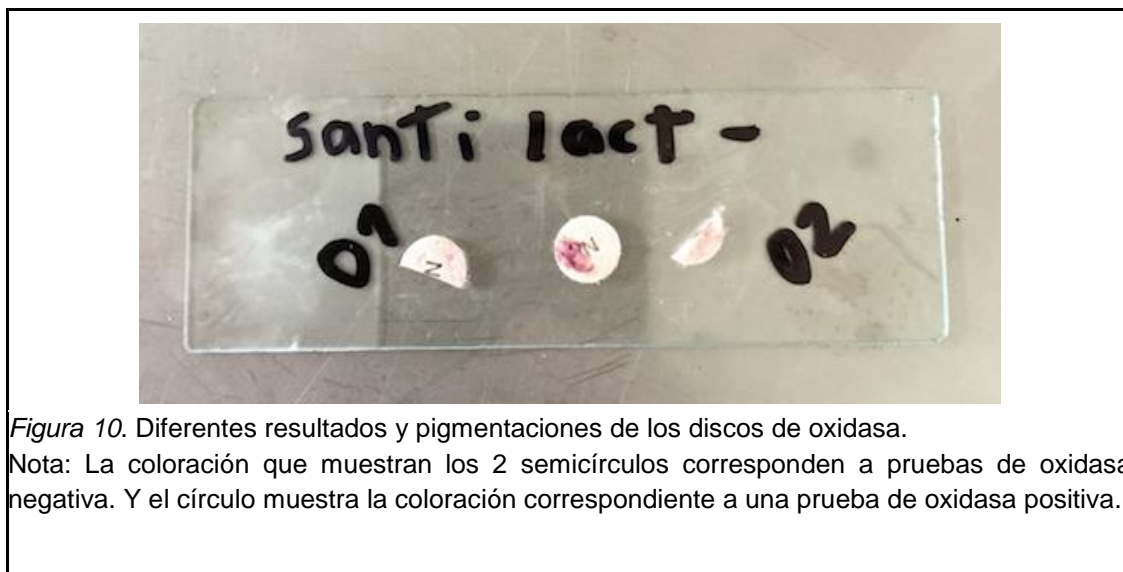


Figura 10. Diferentes resultados y pigmentaciones de los discos de oxidasa.

Nota: La coloración que muestran los 2 semicírculos corresponden a pruebas de oxidasa negativa. Y el círculo muestra la coloración correspondiente a una prueba de oxidasa positiva.

Las colonias bacterianas que resultaron finalmente positivas se identificaron con el test API® 20 E exclusivo para enterobacterias (108 géneros y 104 especies) y otros bacilos Gram Negativos no exigentes.

Para la preparación y suspensión del inóculo bacteriano dentro de la galería API® 20 E y la lectura e interpretación del test, se siguieron las instrucciones del fabricante bioMérieux SA (2016).

- Se colocó sobre la mesa de trabajo el tubo de ensayo con tapa de goma que contenía 5 ml de solución estéril de Cloruro de Sodio al 0,85%, el aceite mineral, 10 ml de agua destilada contenida en el Erlenmeyer de 100 ml, 2 jeringas estériles de 5 ml, el vortex GENUIE, el marcador permanente, el mechero de gas encendido, el gotero de vidrio y el asa bacteriológica de platino en la gradilla de metal, la cámara de incubación API® 20 E, las tiras reactivas API® 20 E y la caja de petri con las colonias bacterianas aisladas.
- Se rotuló la pestaña de la cámara de incubación con el código correspondiente de la muestra y después se instiló agua destilada por toda la cámara de incubación hasta llenar por completo los alvéolos que ésta poseía (para crear una atmósfera húmeda), se ingresó la tira reactiva y luego se cerró la cámara de incubación. Ver *Figura 11*.

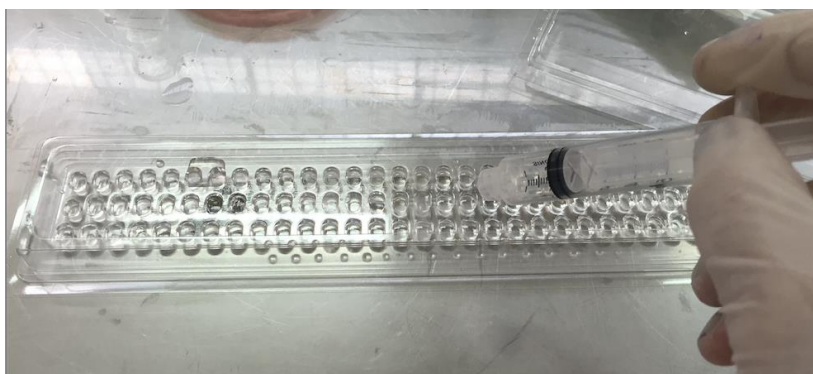


Figura 11. Instilación de agua destilada dentro de los alveolos de la cámara de incubación API® 20 E.

- Se esterilizó el asa bacteriológica con el mechero de gas, se abrió cerca de éste la caja de petri con el aislamiento bacteriano y se tomó con el asa fría una colonia bacteriana bien aislada. Con la mano desocupada, se cerró la caja de petri y después se tomó el tubo de ensayo con la solución de Cloruro de Sodio y se sumergió dentro de él la colonia extraída hasta liberarla del asa. La solución de Cloruro de Sodio junto con la colonia bacteriana se homogeneizó en el vortex GENUIE a 2.300 rpm durante 10 segundos y luego se extrajo la solución homogeneizada del tubo de ensayo con la jeringa estéril.
- Se abrió la cámara de incubación, se introdujo la aguja de la jeringa dentro de los pocillos reactivos tomando contacto con la pared de los mismos y se suspendió la solución de la siguiente manera:
  - A. A las pruebas CIT, VP y GEL se les llenó el tubo y la cúpula de los pocillos.
  - B. A las pruebas restantes sólo se les llenó los tubos.
  - C. A las pruebas ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S y URE se les agregó aceite mineral con ayuda del gotero de vidrio hasta que se llenaron las cúpulas. El gotero fue desinfectado con alcohol y esterilizado con la llama del mechero antes de usarlo.

- Finalmente, se cerró la cámara de incubación API® 20 E y se introdujo en la incubadora a una temperatura de 37° C durante 24 horas.
- Transcurridas las 24 horas, se extrajo la galería de la incubadora y se colocó en la mesa de trabajo junto al mechero de gas encendido. Se sacaron los reactivos API® 20 E de la nevera del laboratorio y también se colocaron en la mesa de trabajo junto al mechero de gas. A la prueba TDA se le agregó 1 gota del reactivo TDA; a la prueba VP, 1 gota del reactivo VP 1 y una gota del reactivo VP 2 y se leyó el resultado después de 10 minutos; y por último, a la prueba IND, 1 gota del reactivo JAMES. Éste último reactivo se añadió al final porque las reacciones que se producen liberan gas y alteran las otras pruebas de la galería.
- Luego se tomó la hoja de anotaciones de los resultados de la galería, se identificó con el código correspondiente, se colocó la fecha completa de la lectura y se leyeron y apuntaron los resultados mediante la “Tabla de Lectura API® 20 E” (ver *Tabla 2*).
- Por último, se realizó la interpretación de los resultados mediante la suma de los tripletes dispuestos en la tira reactiva, con el objetivo de identificar un perfil numérico. Los pocillos negativos se designaron con el signo negativo (-) y los pocillos positivos, con el signo positivo (+). Se sumaron únicamente los dígitos de los pocillos que arrojaron resultados positivos y el número resultante de la suma de éstos, se escribió en el círculo encontrado en la parte inferior de los tripletes dibujado en la hoja de anotación. Se realizó el mismo procedimiento para los 6 tripletes restantes (18 pocillos). El último pocillo del triplete número 7, corresponde al resultado de la prueba de oxidasa. Los últimos 2 tripletes se obviaron porque pertenecían a pruebas complementarias que no aplicaban para la investigación. Ver *Figura 3*.

Es importante señalar que cuando el número de pruebas positivas antes de añadir los reactivos fue inferior a 3, se reincubó la galería por 24 horas más, y

transcurrido ese tiempo, se interpretaron nuevamente los resultados de todos los microtubos sin volver a añadir los reactivos de las pruebas correspondientes.

- Cuando se interpretaron correctamente los resultados y se obtuvo el perfil numérico compuesto de 7 dígitos, se ingresó al software API® web mediante un computador y se tipearon los números del código en el mismo orden. El software identificó perfiles numéricos asociados a buenas identificaciones de géneros de enterobacterias (ver *Figura 12*), perfiles asociados a géneros aceptables (ver *Figura 13*), perfiles dudosos (ver *Figura 14*) y perfiles inaceptables cuando los resultados no eran compatibles con la presencia de enterobacterias u otros bacilos Gram Negativos no exigentes (ver *Figura 15*). Todos los reflejó en porcentajes.

REFERENCIA	FECHA				
Santi02 lact+	20/04/16				
COMENTARIO					
<b>BUENA IDENTIFICACION</b>					
Galería	API 20 E V4.1				
Perfil	1 0 0 5 3 7 3				
Nota	POSIBILIDAD DE Erwinia spp				
<b>Taxón significativo</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Pruebas en contra</b>		
Pantoea spp 3	94.9	0.87	MEL	23%	
<b>Taxón siguiente</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Pruebas en contra</b>		
Pantoea spp 2	1.0	0.56	CIT	99%	SOR 82%

*Figura 12.* Resultado mostrado por API® web de un perfil numérico asociado a buena identificación de enterobacterias.

REFERENCIA	FECHA					
Santi02 lact- x	20/04/16					
COMENTARIO						
<b>IDENTIFICACION ACEPTABLE</b>						
Galería	API 20 E V4.1					
Perfil	0 2 0 0 0 0					
Nota	POSIBILIDAD DE Acinetobacter baumannii/calcoaceticus					
<b>Taxón significativo</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Pruebas en contra</b>			
Pseudomonas oryzihabitans	81.1	1.0				
<b>Taxón siguiente</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Pruebas en contra</b>			
Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp	5.4	0.8	OX	95%		
<b>Pruebas complementarias(s)</b>	<b>AMARILLO</b>	<b>42°C</b>	<b>Tween 80</b>	<b>GLUCOSAAs</b>		
Pseudomonas oryzihabitans	98%	2%	2%	98%		
Acinetobacter baumannii	0%	+	100%	-(-+)		
Acinetobacter calcoaceticus	0%	-	100%	-(-+)		

Figura 13. Resultado mostrado por API® web de un perfil numérico aceptable para la identificación de enterobacterias.

REFERENCIA	FECHA					
Santi01 lact+{Cris 2} x	20/04/16					
COMENTARIO						
<b>PERFIL DUDOSO</b>						
Galería	API 20 E V4.1					
Perfil	0 2 2 5 7 7 3					
Nota	POSIBILIDAD DE Erwinia spp POSIBILIDAD DE Raoultella planticola					
<b>Taxón significativo</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Pruebas en contra</b>			
Pantoea spp 2	42.4	0.17	ONPG 99%	TDA	0%	
Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	38.4	0.07	ONPG 99%	URE	75%	TDA 0%
Serratia ficaria	11.7	0.04	ONPG 99%	TDA	0%	GEL 90%
<b>Taxón siguiente</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Pruebas en contra</b>			
Raoultella terrigena	2.6	0.0	ONPG100%	LDC	99%	TDA 0%
<b>Pruebas complementarias(s)</b>	<b>MOT</b>	<b>5KG</b>	<b>DNAsa</b>	<b>ADONITOLac</b>		
Raoultella planticola	0%	98%	0%	100%		
Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	0%	2%	0%	91%		
Pantoea spp	85%	24%	0%	7%		
Erwinia spp	85%	NT	-(+)	-(-+)		
Serratia ficaria	100%	100%	100%	0%		

Figura 14. Resultado mostrado por API® web de un perfil numérico asociado a géneros dudosos de enterobacterias.

REFERENCIA	FECHA									
Qui04	14/04/16									
COMENTARIO										
Códigos mios										
<b>PERFIL INACEPTABLE</b>										
Galería	API 20 E V4.1									
Perfil	6 3 3 4 0 0 0									
Nota										
<b>Taxón significativo</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Pruebas en contra</b>							
Proteus mirabilis			ADH	0%	LDC	0%	H2S	75%	GEL	82%
Morganella morganii			ADH	0%	LDC	10%	CIT	1%	IND	99%
<b>Taxón siguiente</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Pruebas en contra</b>							
Photobacterium damsela			ODC	0%	CIT	1%	TDA	0%	OX	100%

Figura 15. Resultado mostrado por API® web de un perfil numérico inaceptable en donde no hay asociación con enterobacterias.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Resultados

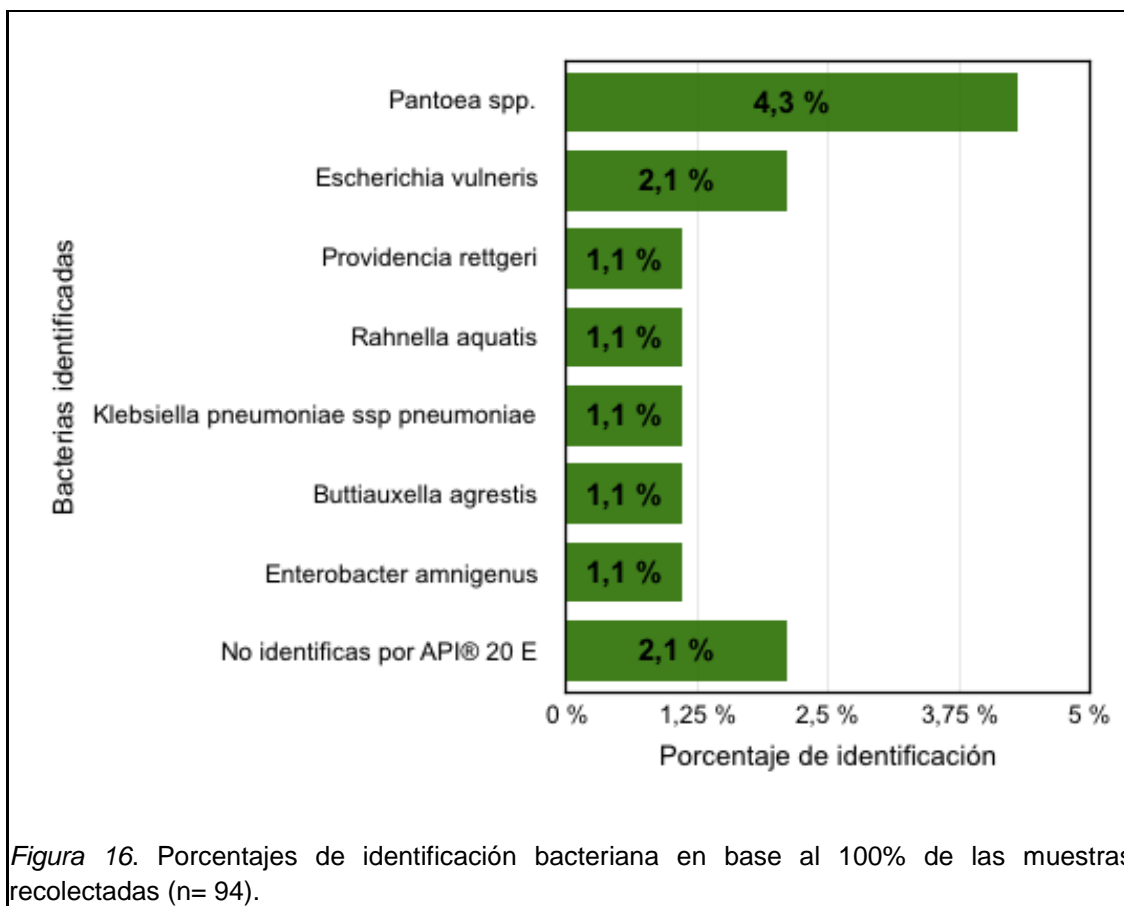
#### 4.1.1 Identificación bacteriana

De las 94 muestras de leche que corresponden al 100%, se obtuvieron 34 (36,2%) macroscópicamente positivas, es decir, que presentaron crecimiento en el agar Mac Conkey; sin embargo, después de que se realizó el análisis microscópico, únicamente 14 (14,9%) resultaron ser bacilos Gram Negativos compatibles con enterobacterias. Las 14 muestras positivas se redujeron a 13 (13,8%) después de realizar la prueba de oxidasa, las mismas que finalmente se analizaron e identificaron mediante la batería bioquímica API® 20 E.

Como muestra la *Figura 16*, el resultado final arrojó la presencia de *Pantoea spp.* en un 4,3%: 0,042 [0,0028-0,0812] IC 95%, *Escherichia vulneris* en un 2,1%: 0,02 [0-0,047] IC 95% (intervalo de una sola cola), y se identificó la presencia individual de *Providencia rettgeri* (1,1%), *Rahnella aquatilis* (1,1%), *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* (1,1%), *Buttiauxella agrestis* (1,1%) y *Enterobacter amnigenus* (1,1%) en 5 muestras diferentes: 0,010 [0-0,029] IC 95% (intervalo de una sola cola), representando un total del 5,5%.

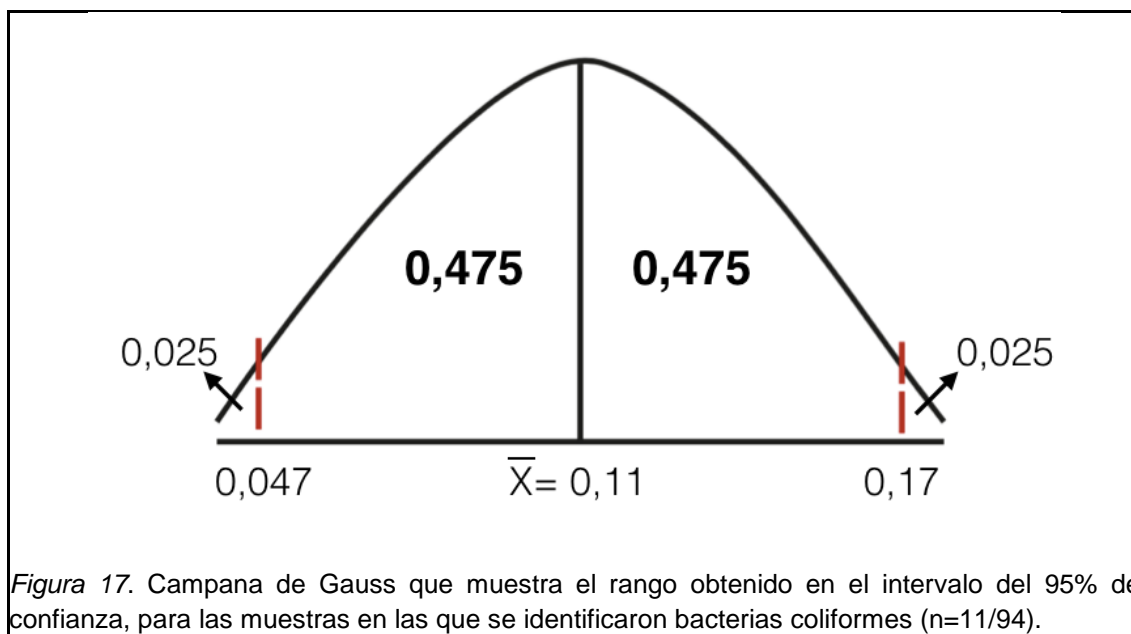
El test API® 20 E no identificó 2 muestras (2,1%), por lo tanto, de la totalidad de muestras recolectadas, únicamente el 13,8% (n= 13/94) resultaron positivas, siendo el 11,7% enterobacterias finalmente identificadas: 0,117 [0,047-0,17] IC 95%.

El valor real de los resultados del estudio, se encuentra con un 95% de probabilidad dentro de los intervalos expuestos anteriormente.



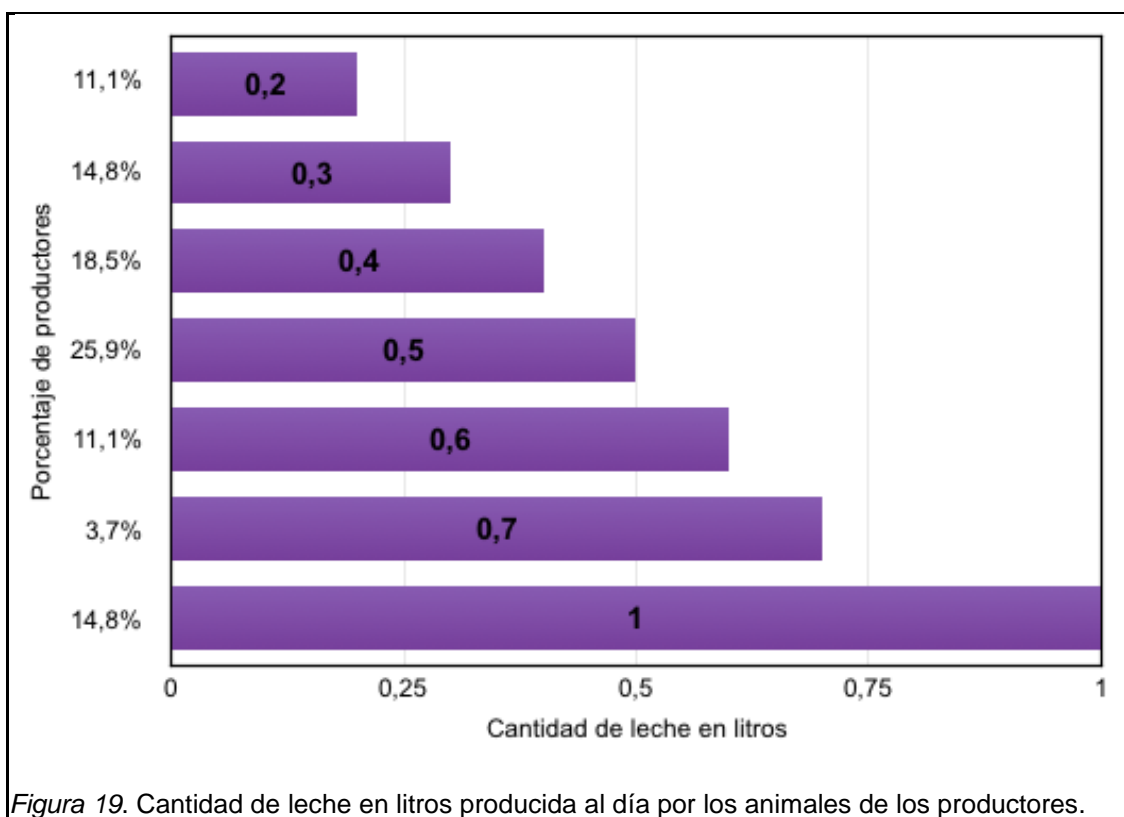
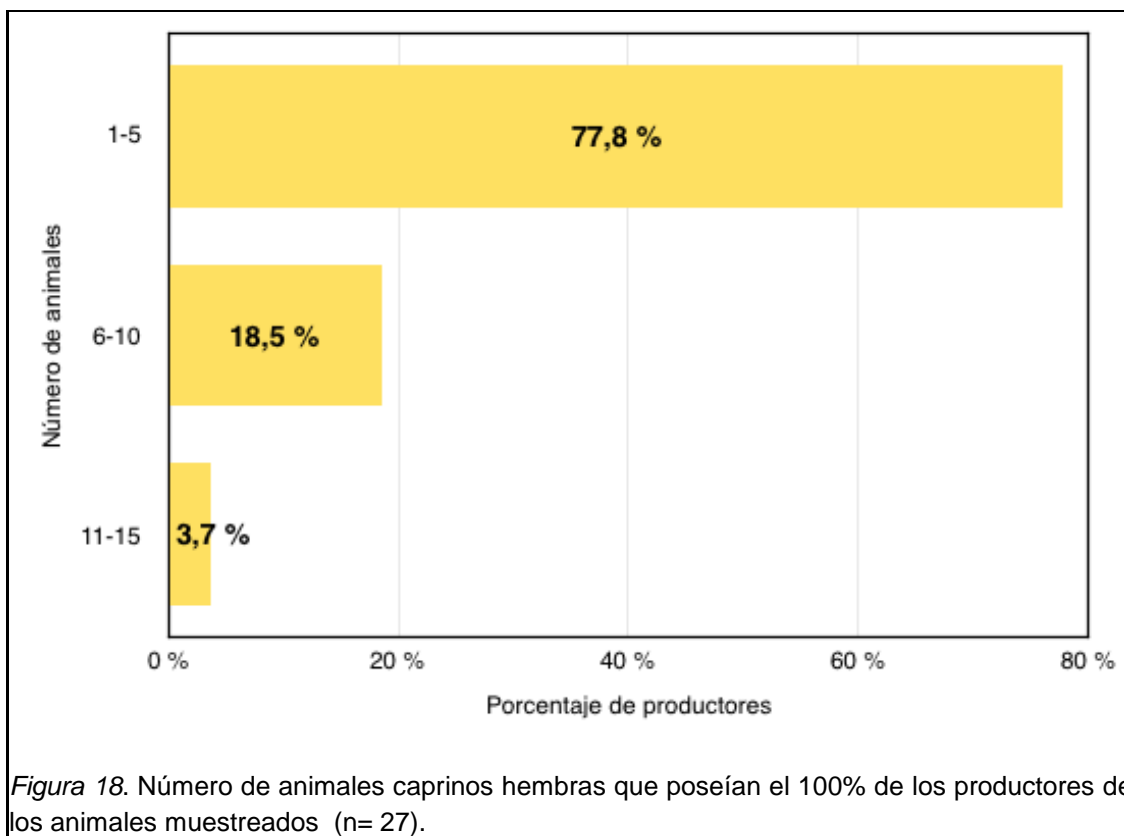
Los datos del 100% de la identificación bacteriana, se representan en una campana de Gauss (*Figura 17*), que indica los valores obtenidos en el cálculo. El resultado de la media fue de 0,11 y se ubica en el centro de la campana. El rango (0,047-0,17) del IC se distribuye a lo largo de la misma, y los extremos, representados por el valor 0,025, indican el rango de error. Los valores ubicados en el centro de la campana (0,475) corresponden a la proporción del 95% de confiabilidad.

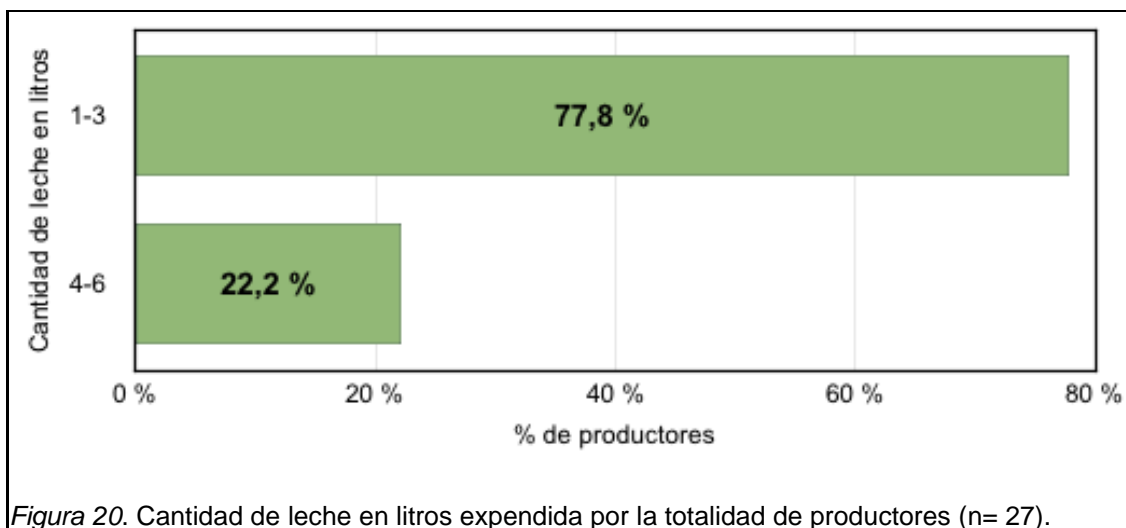




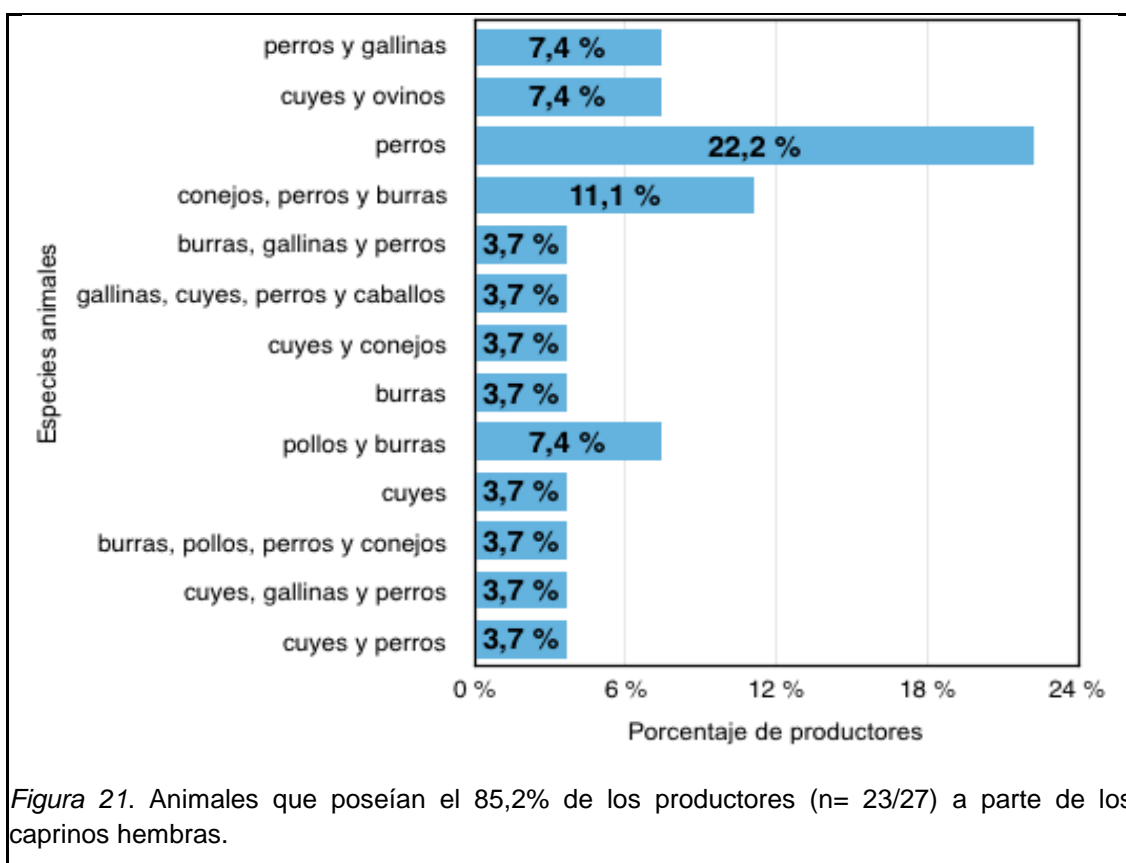
#### 4.1.2 Encuestas a los productores

Se entrevistaron a todos los productores de los animales muestreados, en total 27, de los cuales el 77,8% ( $n= 21/27$ ) coincidieron en tener de 1 a 5 animales caprinos hembras, el resto de productores poseían de 6 a 15 (ver *Figura 18*). El 88,9% ( $n= 24/27$ ) utilizan de 1 a 5 animales para expender leche cruda recién ordeñada a orillas de las calles a pesar de poseer mayor cantidad de animales. La mayoría de los animales de los productores (85,2%) producían al día menos de 1 litro de leche (ver *Figura 19*), por esto, la encuesta reflejó que el 77,8% de los productores ( $n= 21/27$ ) expenden de 1 a 3 litros de leche al día (ver *Figura 20*), los mismos que no separan parte de ésta para su consumo.



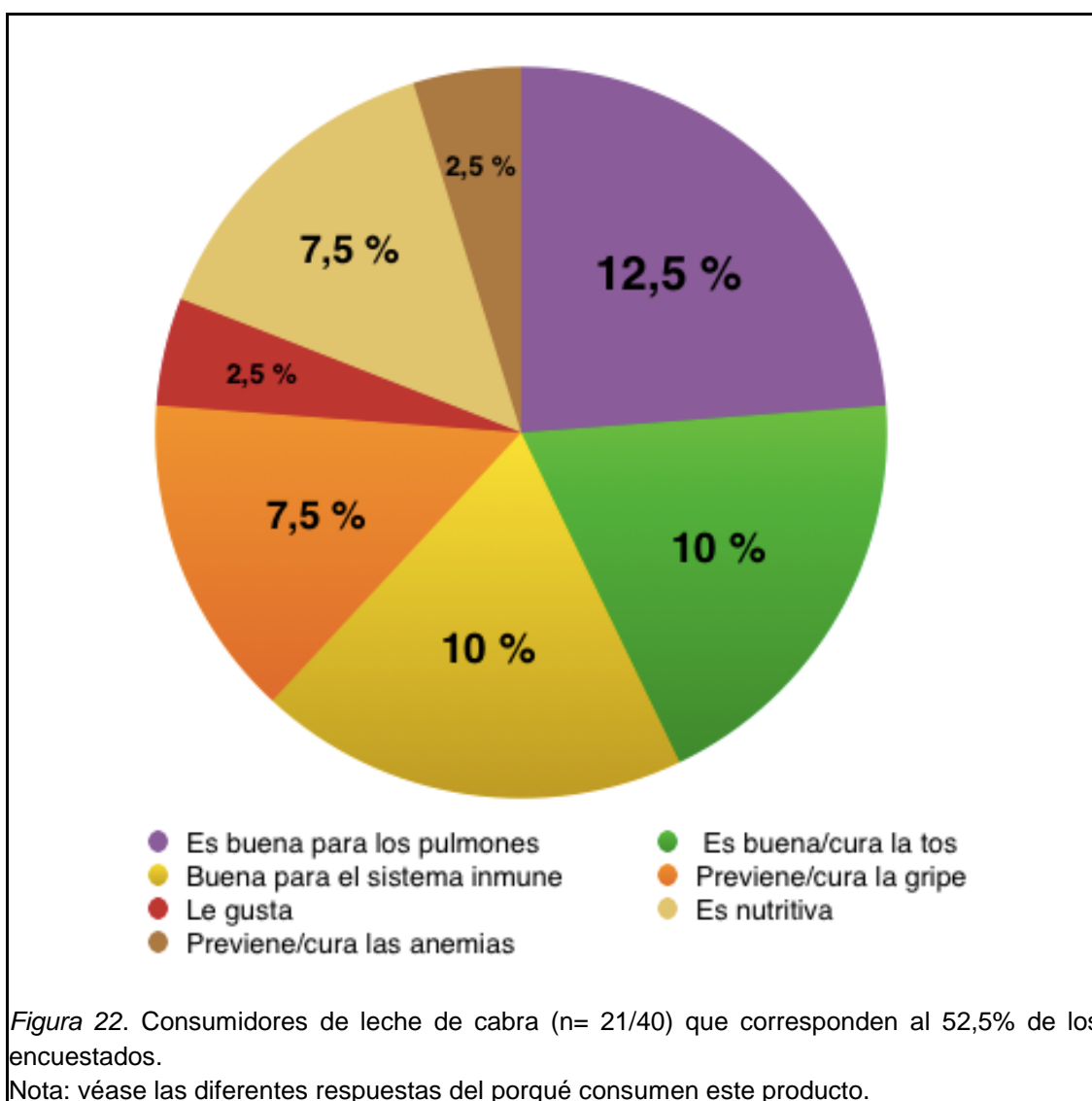


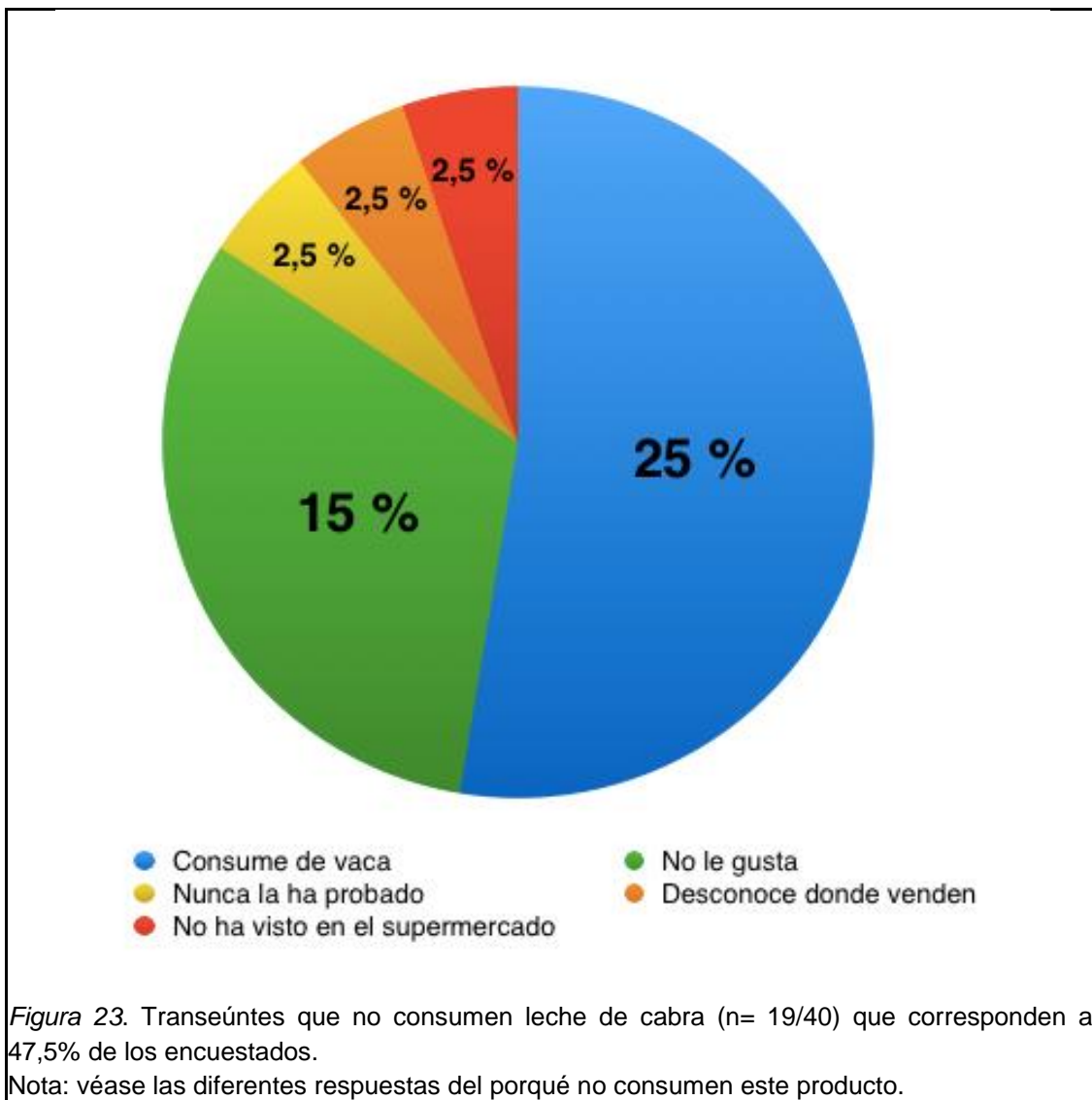
Por otro lado, el 85,2% de los productores (n= 23/27) apuntaron tener animales adicionales a los caprinos hembras, situación importante en la transmisión y diseminación de patógenos coliformes entre distintas especies animales. La *Figura 21* muestra el porcentaje de productores que poseían éstos animales y el tipo de animal.



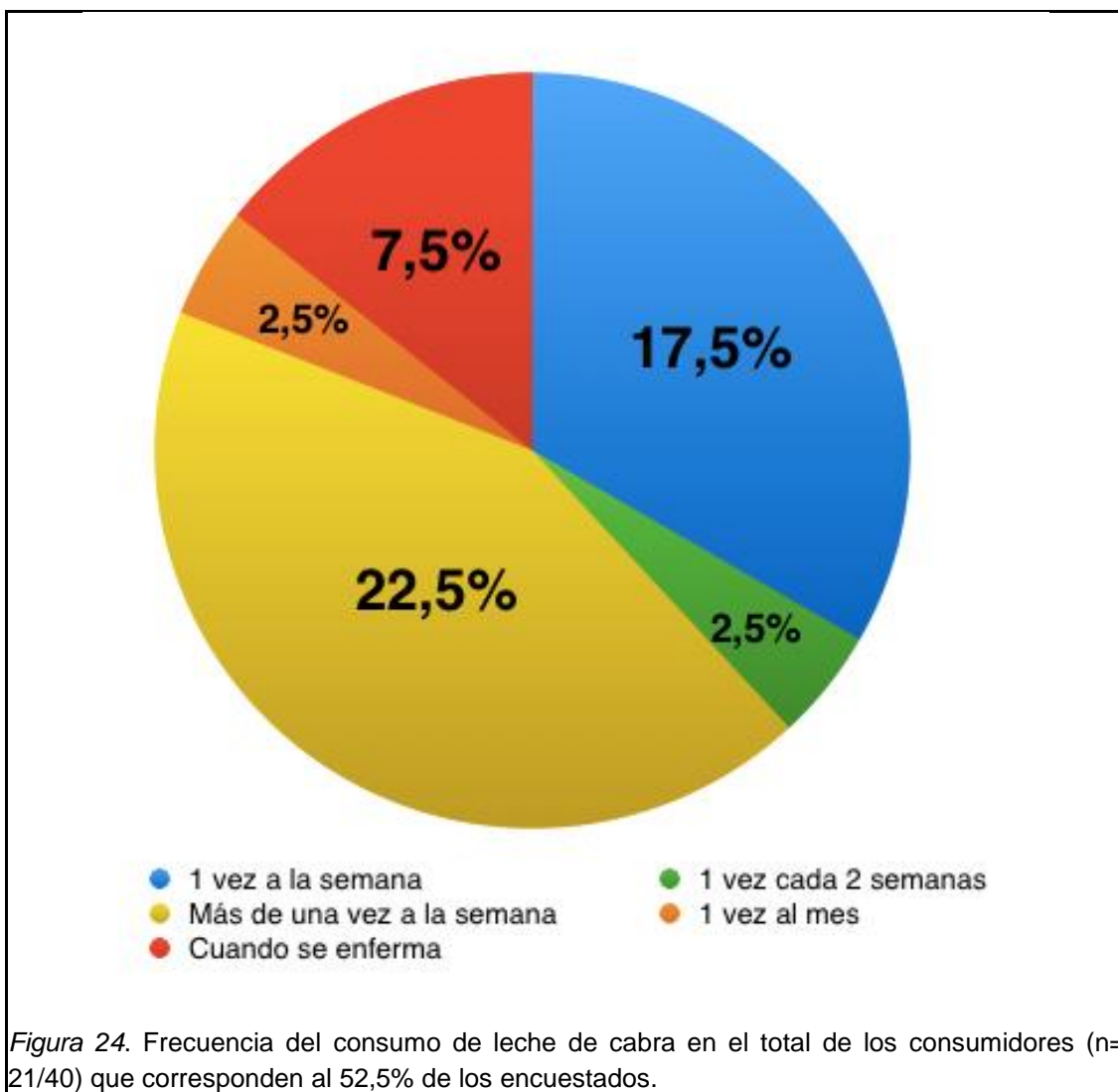
#### 4.1.3 Encuestas a los posibles consumidores

El 52,5% de los encuestados ( $n= 21/40$ ) respondieron que sí consumían leche de cabra, el resto, apuntó que no (47,5%). Sin embargo, los cuestionarios de las encuestas reflejaron distintas respuestas a las interrogantes: “¿Por qué consume leche de cabra?” (ver *Figura 22*) y “¿Por qué no consume leche de cabra?” (ver *Figura 23*). Estas respuestas manifestaron el significado cultural que tiene el consumo de leche cruda de cabras para algunos habitantes y consumidores de este producto en el sur de Quito. También, la razón por la cual otros transeúntes de las zonas de muestreo no consumen el producto.



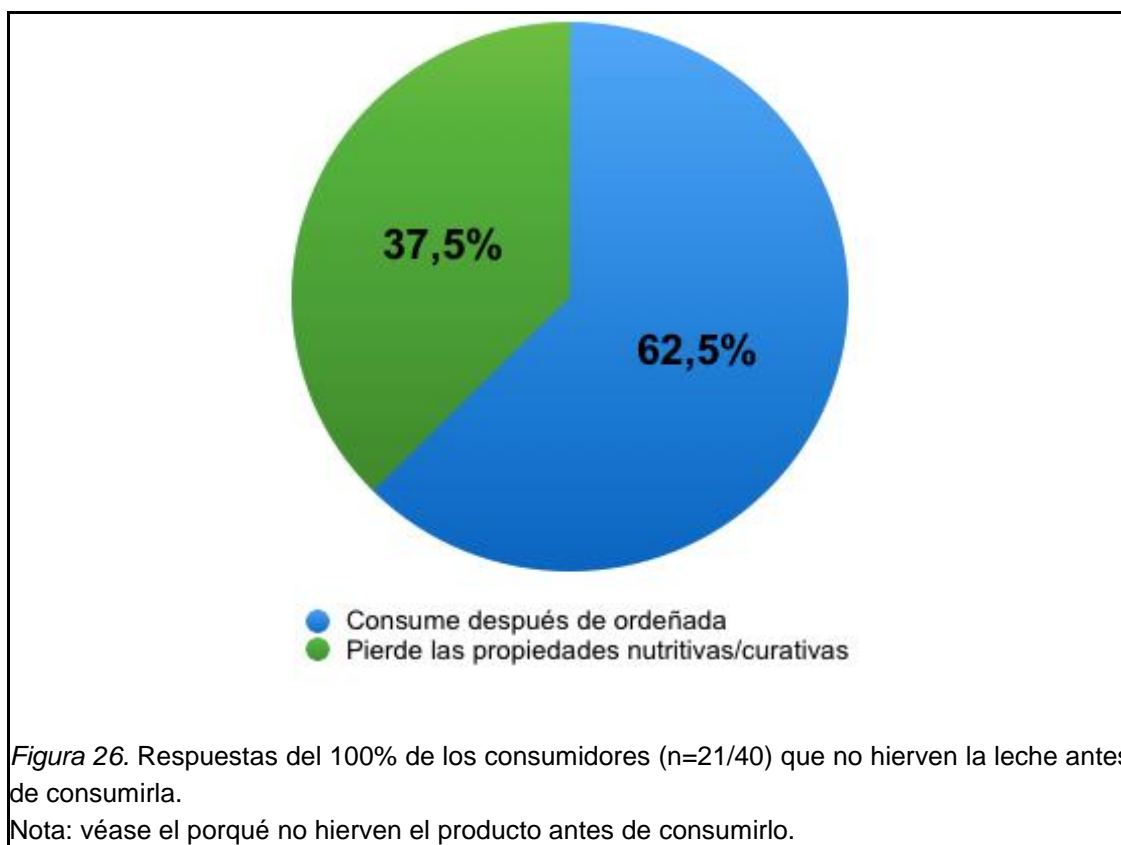
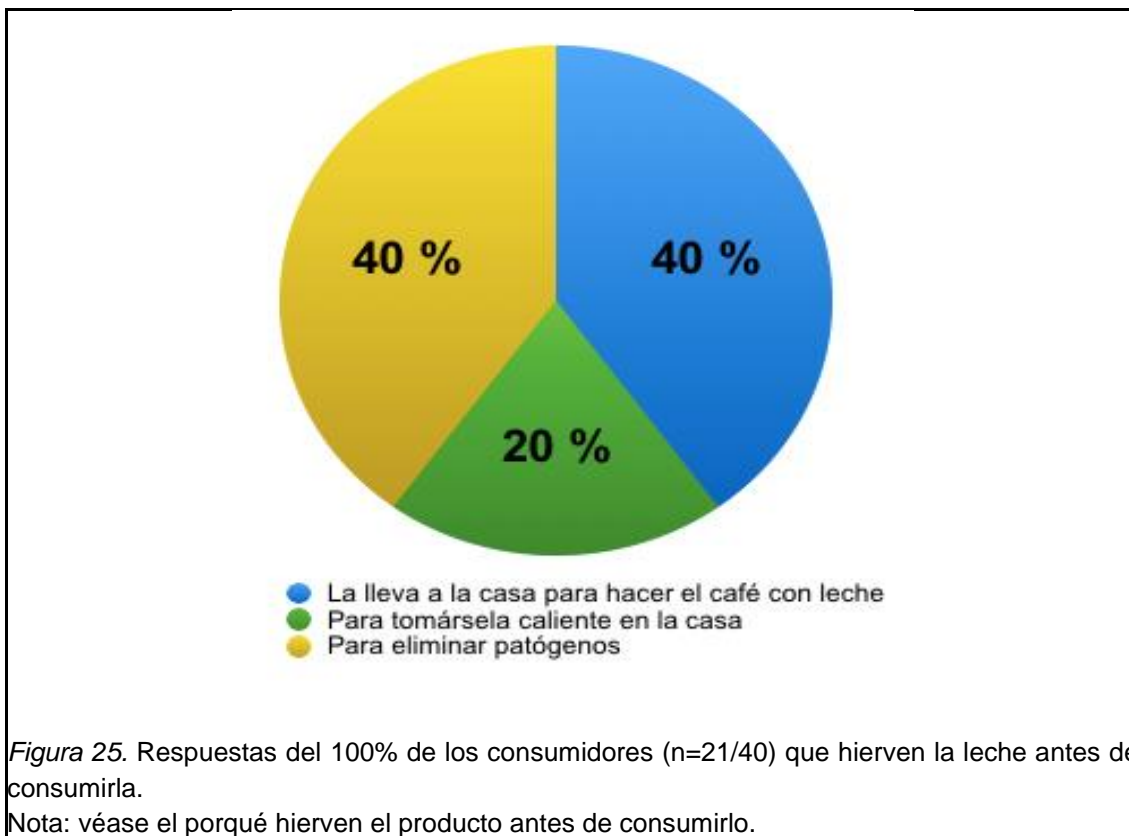


Por otro lado, el 17,5% de los consumidores de leche respondieron que consumían el producto una vez a la semana, el 2,5% respondió que consumía 1 vez cada 2 semanas, el 22,5% más de una vez a la semana, el 2,5% una vez al mes y el 7,5% únicamente cuando se enfermaban (Ver Figura 24).



El 100% de los consumidores de leche caprina (n= 21) coincidieron en adquirir el producto a orillas de las calles. Ninguno afirmó obtener la leche en supermercados, tiendas o por medio de sus propios animales caprinos en el caso de que los tuviese.

Adicionalmente, de los 21 consumidores que equivalen al 52,5% de los transeúntes encuestados, únicamente 5 de ellos, respondieron que hierven la leche antes de consumirla, el resto la consume cruda. A continuación, la *Figura 25* muestra el por qué hierven la leche éstas 5 personas, y la *Figura 26*, el por qué las 16 personas restantes no lo hacen.

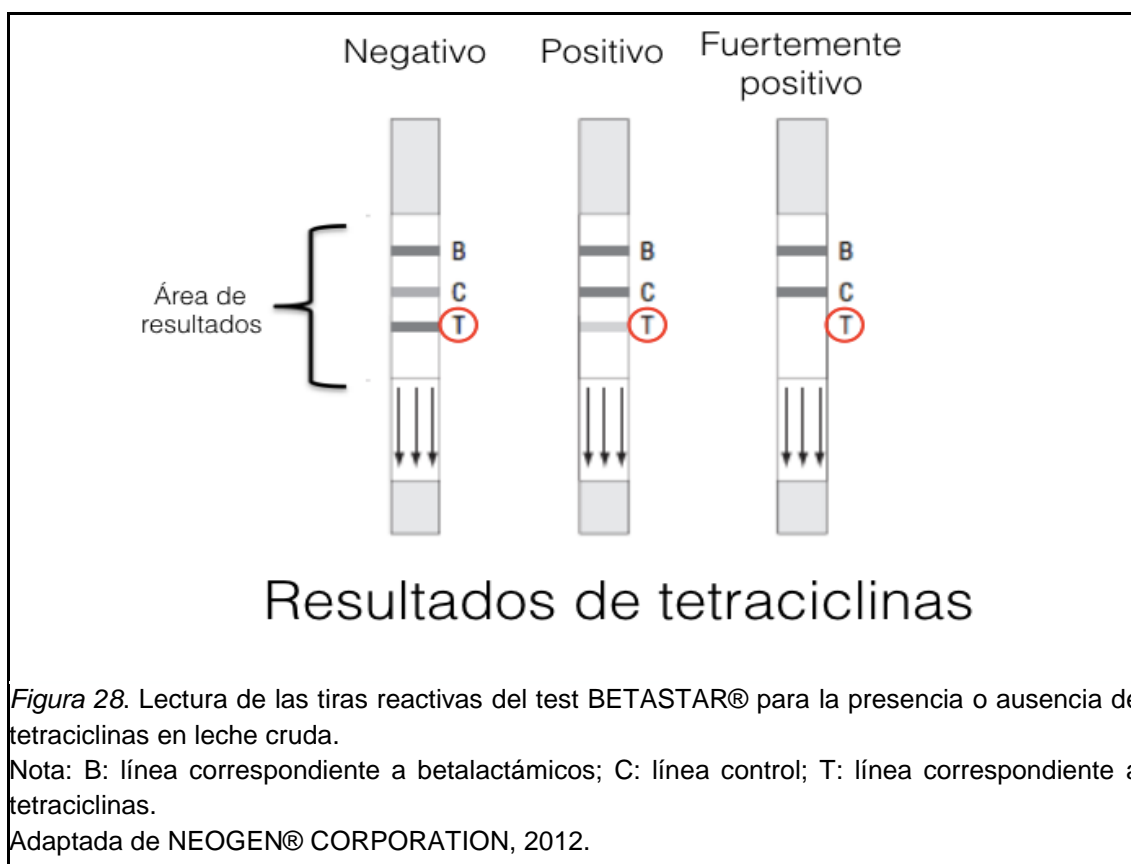
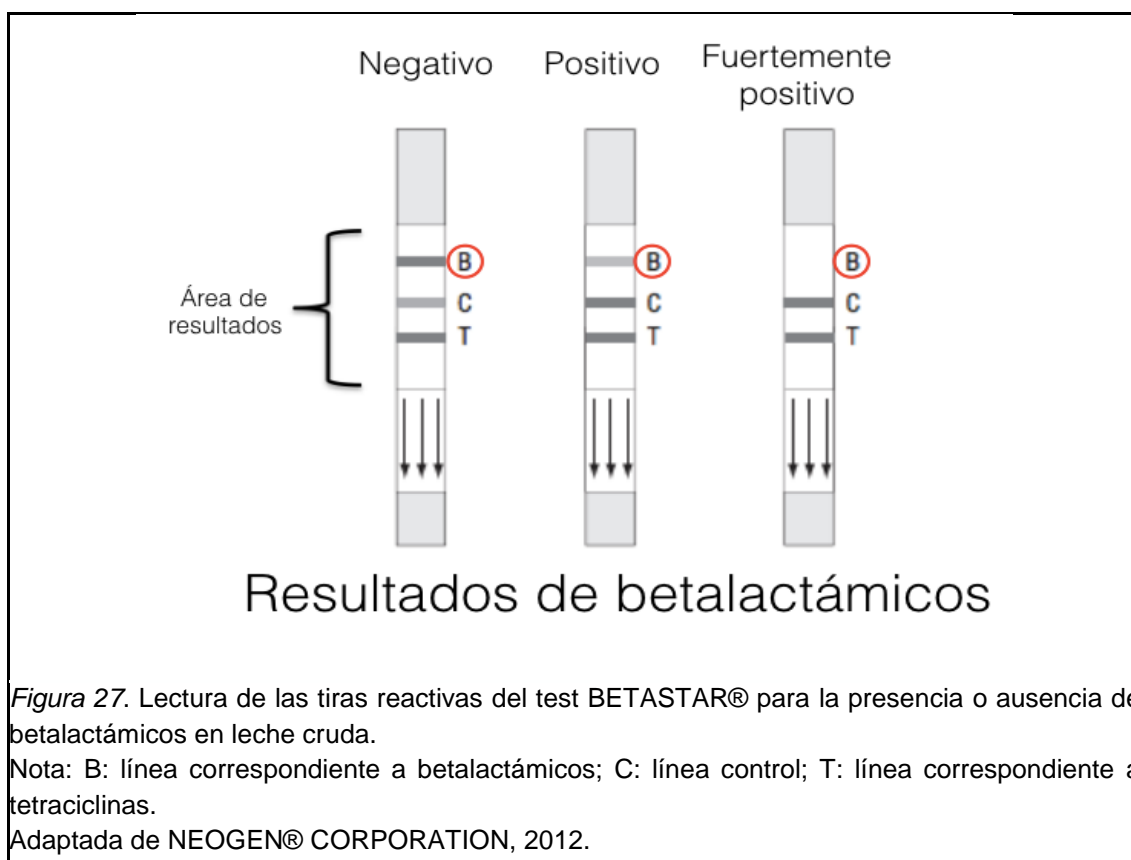


En vista de que en el 88,3% de la totalidad de muestras recolectadas no se aislaron enterobacterias y la mayoría de investigaciones concluyen haber identificado éste tipo de microorganismo en leche cruda no sólo de caprinos, sino de varias especies animales, se decidió realizar pruebas rápidas de detección de antibióticos que no se incluyó en la metodología de la presente investigación.

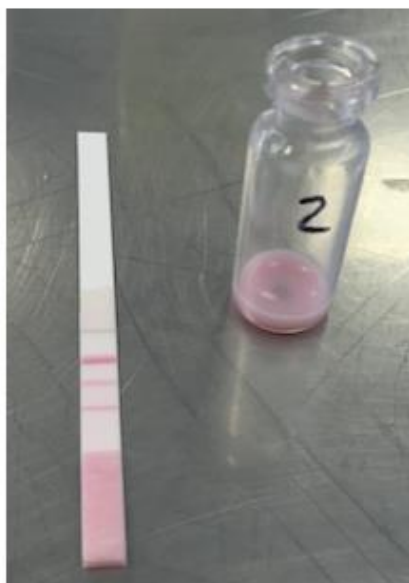
Se realizó el test BETASTAR®, el mismo capaz de identificar en la leche cruda la presencia de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas, por medio de tiras reactivas que contienen líneas capaces de cambiar la intensidad de su coloración cuando existe la presencia de los antibióticos que detecta: si la intensidad es mayor o igual que la línea control, el resultado es negativo para la presencia de antibióticos; en cambio, si la intensidad es menor que la línea control, el resultado es positivo (ver *Figura 27* y *Figura 28*). Cabe destacar que la comparación de la intensidad de las líneas indicadoras de la presencia o ausencia de antibióticos con la línea control, se efectuó de manera inmediata para evitar la obtención de falsos negativos, ya que a medida que transcurre el tiempo, la tiras aumentan paulatinamente la intensidad de su coloración.

Se siguieron las indicaciones del fabricante NEOGEN® CORPORATION tanto para llevar a cabo el procedimiento del ensayo como para la interpretación de los resultados.





Se obtuvieron resultados positivos para la presencia de tetraciclinas (ver *Figura 29*), con lo cual, se pudo constatar que los animales se encontraban bajo los efectos de éste antibiótico, razón por la que probablemente no existió la presencia de enterobacterias en la mayoría de las muestras. La existencia de trazas de antibióticos en la leche, alude a que éste fármaco se encuentra presente en altas cantidades en la circulación sanguínea de los animales.



*Figura 29.* Resultado positivo a la presencia de tetraciclinas en la leche cruda de cabras que se expende en el sur de la ciudad de Quito.

#### **4.2 Contraste de hipótesis**

Las hipótesis planteadas en la presente investigación se orientaron en comprobar si la leche cruda de cabras que es expandida por vendedores ambulantes en el sur de Quito, presenta contaminación por bacterias coliformes capaces de producir enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se conserva la  $H_0$  y se descarta la  $H_1$ , ya que si bien es cierto, se identificaron bacterias coliformes, estas según la literatura, no producen enfermedades que se transmitan por el consumo de

alimentos contaminados, sino que la mayoría de ellas, actúan como patógenos oportunistas en pacientes inmunosuprimidos, causando infecciones nosocomiales, respiratorias, urinarias, entre otras. Sin embargo, con la finalidad de obtener información adicional, se realizaron pruebas rápidas de detección de antibióticos a un pool de muestras de leche, que reveló la presencia de tetraciclinas. Al haberse realizado el test en forma de pool, no se pudo conocer si la contaminación de la leche por antibióticos provenía de la totalidad o de una de ellas. Por lo tanto, que no se hayan identificado coliformes que produzcan ETA's en los consumidores, no significa que no estén presentes en la leche cruda de cabras que se expende en este lugar, sino que, durante el periodo de muestreo pudieron encontrarse en mínimas cantidades, dificultando el aislamiento y la identificación en el laboratorio, o al contrario, fue controlada su multiplicación por el efecto bacteriostático del antibiótico detectado.

### 4.3 Discusión

El estudio realizado en el año 2009 en la Universidad del Zulia-Venezuela por García *et al.*, arrojó un 35% de positividad a la presencia de coliformes en leche cruda de cabras. De ese 35%, el 40% correspondió a la presencia de *Escherichia coli*, el 25% a *Enterobacter sakasaki*, el 20% a *Citrobacter spp.*, el 10% a *Enterobacter spp.* y el 5% a *Klebsiella spp.*. De los 4 géneros bacterianos encontrados en dicho estudio, el 75% de ellos (*Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*) coincidieron con los géneros bacterianos identificados en la presente investigación. Sin embargo, las especies de *Escherichia* (*E. coli*) y *Enterobacter* (*E. sakasaki*) no concuerdan con las encontradas en éste estudio. A pesar de esto, la presencia de todos los microorganismos nombrados, evidencian una baja calidad bacteriológica de la leche.

Quigley *et al.* (2013) en Oxford, realizaron un estudio en donde reportaron las enterobacterias aisladas con mayor frecuencia en la leche cruda de 118 cabras extraídas a nivel del pezón, el resultado final también coincidió con algunos géneros y especies de enterobacterias aisladas en la presente investigación: *Pantoea spp.*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia spp.*. Otro estudio realizado

en México por Ruiz, Cervantes, Ducoing, Hernández y Martínez, apuntó en ese mismo año (p. 99) que *Klebsiella* fue aislada en un bajísimo porcentaje (1,03%) en la leche cruda de 97 cabras criadas bajo sistemas de producción intensivo y semi intensivo. Ésta contradicción en los resultados de los diferentes estudios puede deberse a los métodos de crianza y manejo de los animales muestreados en las 2 investigaciones, pues los del estudio de Quigley *et al.* eran individuos pertenecientes de varios pisos geográficos criados bajo distintos métodos y sistemas de producción, y los del estudio mexicano, como se mencionó anteriormente, correspondían únicamente a animales criados bajo sistemas de producción intensivo y semi intensivo. Usualmente la aparición de enterobacterias en la leche es indicador de contaminación fecal por mal manejo higiénico de los animales o del producto después de su obtención, es por ésto, que los sistemas de producción influyen directamente sobre la calidad de los productos.

A pesar de que en varias investigaciones se haya aislado *Klebsiella pneumoniae*, ésta es una bacteria que mayormente causa problemas en aparato respiratorio, sin embargo, no se excluye de provocar infección en otros sistemas, pues también puede causar artritis, meningitis y septicemias (Arroyo y Caballero, 2014, p. 75 y Bordeanu, Krupaci, Kiss y Spinu, 2005, p. 40).

La presencia de *Escherichia vulneris* fue atribuida en un estudio realizado en el presente año a leche de cabras que presentaban mastitis (Gutiérrez-Chávez *et al.*, 2016, párr. 1), pero a pesar de ocasionar signos patológicos en los animales que infecta, Saad, Sabreen, Amin y Gendi (2012, p. 333) apuntaron que ésta bacteria es inofensiva para los humanos cuando es consumida accidentalmente por los alimentos; no obstante, puede causar enfermedades urinarias como patógeno oportunista en personas inmunosuprimidas.

Por otra parte, en Algeria se investigó durante 11 meses consecutivos las bacterias que se encontraban presentes en la leche cruda de 298 cabras con mastitis sub clínica, arrojando un 54,02% de positividad al aislamiento de la

familia *Enterobacteriaceae*. Del 100% de las enterobacterias aisladas, el 23,4% correspondió a *Pantoea* spp. y *Escherichia coli*, el 53,31% a *Klebsiella* spp., el 17,02% a *Enterobacter* spp. y el porcentaje restante a *Citrobacter* spp. y *Kluyvera* sp. (Bourabah, Ayad, Boukraa, Hammoudi y Benbarek, 2013, pp. 604-607). Como parte de las conclusiones de éste trabajo, éstos autores coincidieron con los anteriores, en cuánto a que la identificación de éstas bacterias en la leche cruda no tienen un impacto significativo en la salud de los consumidores, a excepción de *Escherichia coli* que tiene impacto ETA's y *Enterobacter* spp. que según Lopardo, Predari y Vay (2016, p. 133) puede transportar plásmidos que codifican resistencia a antibióticos, teniendo importancia en la aparición de infecciones nosocomiales.

También existen microorganismos que forman parte de la microflora deseable de algunos alimentos como la leche y el queso, y por lo tanto, tampoco causan normalmente enfermedades en los seres humanos. Esto puede confirmarse con el estudio de Gianotti (1999, p. 6) realizado en Suiza, donde se aislaron enterobacterias en quesos frescos, entre ellas *Providencia rettgeri*. Ésta misma bacteria fue igualmente aislada en la presente investigación, así que la presencia de ella en la leche cruda de cabras que se expende en el sur de Quito puede también estar vinculada como microorganismo deseable en la leche y no como patógeno contaminante y causante de ETA's. Pero, al mismo tiempo en otro estudio realizado en el 2001, se describió la importancia clínica que puede llegar a tener ésta bacteria como patógeno oportunista causante de enfermedades urinarias (Goenaga, Morán, Carrera, Garde y Millet, 2001, párr. 2), lo que puede indicar que *Providencia rettgeri* únicamente tiene la capacidad de patogenizarse cuando el sistema inmunológico del hospedador que infecta no es competente.

En el año 2005 (p. 42), Bordeanu, Krupaci, Kiss y Spinu identificaron *Rahnella aquatilis* (2,7%) mediante el test API® 20 E, de muestras extraídas de secreciones del tracto respiratorio de 20 cabras clínicamente sanas muestreadas en la temporada de primavera, que indicó que la presencia de

ésta bacteria en el tracto respiratorio puede ser inofensiva para los animales en determinadas épocas del año, pero a la vez, tiene importancia clínica cuando interactúa con otros géneros bacterianos potencialmente patógenos como *Escherichia* spp. y *Klebsiella* spp., concluyendo que ésta bacteria actúa como patógeno oportunista.

En éste sentido, otros estudios realizados por Herrera, Vargas y Herrera (2000, párr. 8 y 17); Bordeanu, Krupaci, Kiss y Spinu (2005, párr. 13) y Moya *et al.* (2016, p. 129), afirmaron la presencia de *Rahnella aquatilis* como causante de infecciones nosocomiales y bacteriemias en pacientes inmunosuprimidos, con trasplante renal, sondas urinarias, enfisema, leucemia linfocítica crónica e inclusive también, en pacientes sin aparente compromiso inmunológico.

Por el contrario, otras publicaciones la asociaron como microorganismo deseado cuando es añadida, para varios fines: como biocatalizador para la elaboración de quesos frescos, fermentador del suero de la leche, modificador de la grasa de la leche, reductor de otros microorganismos contaminantes (Malcata, 2010, pp. 1595-1599) e inclusive como antagonista fitopatógeno en la podredumbre de manzanas (Calvo, 2009, p. 38), ofreciendo mejoras en las características organolépticas de algunos alimentos. Se sabe que es una bacteria frecuentemente aislada del agua fresca y los alimentos, rara vez produce infección en los animales y humanos porque es de baja virulencia, pero como se ha ejemplificado, hay casos publicados de infecciones por *Rahnella aquatilis* que asocian a ésta bacteria como patógeno oportunista.

Tiene importancia la relación que existen entre el consumo de leche cruda contaminada por enterobacterias que actúan como patógenos oportunistas, y el estado de salud de las personas que la consumen, pues los resultados de las encuestas, reflejaron que gran parte de los consumidores ingerían esta leche cuando se enfermaban, tenían tos, gripe o anemia; creyendo que el producto tiene propiedades curativas. En éste sentido, el problema puede presentarse, pues el sistema inmunológico de personas comprometidas de salud, no es

eficaz y las enterobacterias que normalmente son inofensivas, pueden patogenizarse y causar enfermedades.

Con respecto al aislamiento y la identificación de *Buttiauxella agrestis* en la leche cruda de cabras, Amarita, Alkorta, Lescan du Plessix, Cantabrana y Rodriguez-Fernandez (1995, p. 630), demostraron que ésta bacteria tiene actividad beta-galactosidasa importante, por lo cual es valorada en la industria láctea, específicamente para la reducción o eliminación de la lactosa en productos lácteos, pudiendo ser consumidos por algunas personas intolerantes.

Por otra parte, Trindade, Damasceno, da Gama Pantoja, de Figuereido, da Silva y da Cruz Rodriguez (2015, p. 576) identificaron ésta bacteria en dos especies diferentes de peces (*Cichla ocellaris* y *Brachyplatystoma vailantii*), la misma que conformaba parte de la microflora normal. *Buttiauxella agrestis* es una bacteria que forma parte de la biopelícula del agua dulce y salada, por esto también se ha aislado de moluscos e insectos (Lopardo, Predari y Vay, 2016, p. 334).

Aunque por la naturaleza de la investigación, únicamente se hayan identificado en la leche cruda de cabras que se expende en el sur de Quito, los microorganismos mencionados anteriormente, no significa que no puedan estar presente en el producto otros patógenos bacterianos causantes de enfermedades en los seres humanos.

Por último, Plumb (2010, p. 992) y Charbek (2015, párr. 2) afirman que los géneros *Escherichia*, *Providencia*, *Klebsiella* y *Enterobacter* son normalmente resistentes a las tetraciclinas, muy probablemente por esto pudieron aislarse sin complicación en las muestras de leche recolectadas. La presencia de antibióticos en la leche cruda que se expende en el sur de Quito, determina un problema de salud pública más severo que la presencia de las enterobacterias aisladas e identificadas en la presente investigación; el problema principal no sólo radica por la resistencia a los antibióticos que pueden adquirir los

consumidores, sino que también se ha demostrado que las tetraciclinas pertenecen al grupo de las drogas categoría D durante el embarazo, es decir, puede producir riesgo fetal humano, malformaciones congénitas y/o embriotoxicidad a mujeres embarazadas; además, también puede causar alergias, diarreas y anafilaxias en consumidores alérgicos (Plumb, 2010, p. 993).

#### **4.4 Limitaciones del estudio**

Al ser el primer estudio en el Ecuador, que identificó coliformes presentes en la leche cruda de cabras que es expandida por vendedores ambulantes en el sur de la ciudad de Quito, existen varias limitantes que no permitieron la asociación completa del estudio, y por lo tanto, dejó un campo amplio de investigación:

- No existe identificación por medio de areteo con numeración única e irrepetible, de los animales que son criados con el sistema de traspatio en este sector de la ciudad. Por lo tanto, tampoco existen censos poblacionales de los caprinos establecidos en el sur de Quito, que impidió el cálculo de un tamaño muestral verdaderamente significativo.
- No hay extensión pecuaria hacia los productores caprinos de la zona, por esto, el trabajo de campo sobre estos animales, únicamente se pudo realizar si existía interés y simpatía por parte de los productores.
- Los reportes de las enfermedades transmitidas por agua y alimentos contaminados, que son emitidos por el Ministerio de Salud, no son de acceso público, y no se pudo relacionar los patógenos identificados en el producto, con las ETA's reportadas en el sector durante el periodo de muestreo, sino que se limitó a establecer relaciones en base a la literatura.
- El expendio de la leche cruda de cabras en el sur de Quito, se realiza de forma ambulante, por lo tanto, se dificultó localizar rápidamente a los vendedores.



- El tiempo destinado por parte de la universidad, para la elaboración del estudio, fue muy corto, lo cual impidió la recolección de mayor cantidad de muestras de leche, una identificación mucho más específica de las bacterias halladas, la implementación de soluciones al problema encontrado, entrevistar a mayor cantidad de transeúntes cercanos a la zona de expendio del producto, entre otros.

En base a estas limitantes, se establecieron las conclusiones y recomendaciones de la presente investigación.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

- Se identificaron a 27 productores que expendían leche cruda de cabras a orillas de las carreteras, en 13 lugares diferentes del sur de la ciudad de Quito, de los cuales se obtuvieron 94 muestras de leche de distintos animales. El 88,9% de los productores mantenían de 1 a 5 caprinos hembras para obtener el producto, a pesar de contar con más animales de ésta especie. Adicionalmente, no resultó fácil la identificación de los productores porque no vendían la leche en una sola ubicación, sino que ofrecían el producto, de forma ambulatoria, recorriendo las calles.
- De las 11 muestras positivas de leche cruda de cabras (11,7%), se identificaron 7 géneros bacterianos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, que corresponden a: *Pantoea* spp. en 4 muestras (4,3%), *Escherichia vulneris* en 2 muestras (2,1%), *Providencia rettgeri* en 1 muestra (1,1%), *Rahnella aquatilis* en 1 muestra (1,1%), *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* en 1 muestra (1,1%), *Butiauxella agrestis* en 1 muestra (1,1%) y *Enterobacter amnigenus* en 1 muestra (1,1%).
- De los 7 géneros bacterianos identificados en las 11 muestras de leche cruda de cabras, únicamente 1 género (*Escherichia* spp.), tuvo relación directa con ETA's. Sin embargo, la especie identificada de este género (*E. vulneris*), junto con los géneros y especies: *Pantoea* spp., *Enterobacter amnigenus*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, *Rahnella aquatilis* y *Providencia rettgeri*, estuvieron asociados, mayormente a producir, como patógenos oportunistas, bacteriemias, infecciones urinarias, respiratorias y nosocomiales en humanos y animales. No obstante, *Rahnella aquatilis*, también es considerada como microorganismo con efecto probiótico e inhibidor de fitopatógenos que ocasionan la podredumbre de manzanas, y *Providencia rettgeri*, como bacilo valorado en la industria quesera. Por otro

lado, *Buttiauxella agrestis*, sólo fue relacionada como microorganismo que tiene efecto probiótico cuando está presente en lácteos.

## 5.2 Recomendaciones

- Investigar la posible presencia de otras formas bacterianas como *Streptococcus agalactiae* y/o *Staphylococcus aureus* en la leche cruda de cabras que se expende en el sur de la ciudad de Quito, para conocer más a profundidad la calidad bacteriológica de éste producto.
- Determinar la presencia y tipos de antibióticos en la leche cruda de cabras que se expende en el sur de la ciudad de Quito, con la finalidad de describir los problemas de salud pública que ésto ocasiona.
- Realizar estudios que revelen cuál es la fuente de contaminación de la leche cruda de cabras que se expende en el sur de la ciudad de Quito, mediante el análisis, por ejemplo, del agua, las heces de los animales, las manos de los ordeñadores e inclusive de los vasos y/o bolsas plásticas que utilizan para expender el producto. De ésta manera se podrían implementar protocolos que garanticen una óptima calidad bacteriológica de la leche para su consumo.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, no se recomienda consumir la leche cruda de cabras que es expandida por vendedores ambulantes en el sur de la ciudad de Quito, porque presenta trazas de antibióticos y contaminación por enterobacterias, que si bien no causan ETA's, tienen la capacidad de producir infecciones en diferentes sistemas en personas inmunocomprometidas. Éste producto debería procesarse en una industria láctea que garantice un óptimo control sanitario, tanto para la presencia de microorganismos, como para la de restos de antibióticos.

- Controlar por parte de las autoridades competentes, el expendio indiscriminado de éste producto, el cual representa un problema de salud pública.

## REFERENCIAS

- Acheson, D. (2014). Differential diagnosis of microbial foodborne disease. Recuperado el 14 de enero de 2016 de [http://www.uptodate.com/contents/differential-diagnosis-of-microbial-foodborne-disease?source=search\\_result&search=food+borne&selectedTitle=1~95](http://www.uptodate.com/contents/differential-diagnosis-of-microbial-foodborne-disease?source=search_result&search=food+borne&selectedTitle=1~95)
- Alais, C. (1985). CIENCIA DE LA LECHE Principios de técnicas lecheras. Barcelona, España: EDITORIAL REVERTÉ, S.A.
- Alcayaga, S. y Hott, B. (2008). Listeria y listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. *Revista Chilena de Salud Pública*. 12(3) p. 188. Recuperado el 10 de abril del 2016 de <http://www.revistasaludpublica.uchile.cl/index.php/RCSP/article/viewFile/2216/2094>
- Algorta, G. y Shelotto, F. (2008). Principales grupos de bacilos gramnegativos no exigentes. Recuperado el 24 de abril del 2016 de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/gramnegativosnoexigentes.pdf>
- Amarita, F., Alkorta, F., Lescan du Plessix, M., Cantabrana, T. y Rodriguez-Fernandez, C. (1995). Isolation and properties of free and immobilized beta-galactosidase from the psychrotrophic enterobacterium *Buttiauxella agrestis* (strain NC4). *US National Library of Medicine National Institutes of Health*. 78(6), p. 630
- Araya, V., Gallo, L., Quesada, C., Chaves, C. y Arias, M. (2008). Evaluación bacteriológica de la leche y queso de cabra distribuidos en el Área Metropolitana de San José, Costa Rica. Recuperado el 01 de octubre de 2015 de [http://www.alanrevista.org/ediciones/2008-2/pdf/evaluacion\\_leche\\_queso\\_costa\\_rica.pdf](http://www.alanrevista.org/ediciones/2008-2/pdf/evaluacion_leche_queso_costa_rica.pdf)
- Aréchiga, Aguilera, J., Rincón, R., Méndez de Lara, S., Bañuelos, V. y Meza-Herrera, C. (2008). SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE LA PRODUCCIÓN CAPRINA ANTE EL RETO DE LA GLOBALIZACIÓN.

- Recuperado el 27 de junio del 2016 de <http://www.redalyc.org/html/939/93911227001/>
- Arrollo, E. y Caballero, R. (2014). MENINGITIS A KLEBSIELLA PNEUMONIAE: PATOLOGIA PRESENTE EN LA COMUNIDAD. Recuperado el 13 de mayo del 2016 de <http://www.sap.org.ar/docs/congresos/2014/resumenesTrabajosLibres.pdf>
- Ayala, C. (2009). DETERMINACIÓN DE LAS BACTERIAS MAS FRECUENTES CAUSANTES DE MASTITIS SUBCLÍNICAS Y SENSIBILIDAD ANTE ANTIBIÓTICOS EN CABRAS CRIOLLAS DEL MUNICIPIO DE SANTA APOLONIA, CHIMALTENANGO. Recuperado el 02 de abril del 2016 de <http://www.repositorio.usac.edu.gt/3280/1/Tesis%20Med%20Vet%20Christrian%20Ayala.pdf>
- Bacillos, A. (Octubre, 2015). Serratia. *Revista Medscape*. 8(10). Recuperado el 25 de abril del 2016 de <http://emedicine.medscape.com/article/228495-overview#a4>
- Barioglio, C. (2001). *Diccionario de Producción Animal*. (1.<sup>a</sup> ed.). Córdoba, Argentina: Editorial Brujas.
- BC Centre for Disease Control. (2015). Yersiniosis. Recuperado el 14 de enero de 2016 de <http://www.healthlinkbc.ca/healthfiles/bilingua/spanish/hfile77-S.pdf>.
- Becton Dickinson®. (2013). BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified. Recuperado el 23 de abril del 2016 de <https://www.bd.com/resource.aspx%3FIDX%3D8765>
- Bedolla, C., Bedolla, E., Castañeda, H., Wolter, W., Castañeda, M. y Kloppert, B. (2012). MASTITIS CAPRINA. Recuperado el 01 de abril de 2016 de [http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2012/9014/pdf/BedollaCedenoMastitis\\_Caprina2012.pdf](http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2012/9014/pdf/BedollaCedenoMastitis_Caprina2012.pdf)
- Bedoya, O., Rosero, R. y Posada, S. (2016). Composición de la leche de cabra y factores nutricionales que afectan el contenido de sus componentes\*.

Recuperado el 10 de abril del 2016 de [http://www.academia.edu/8060655/Composicion\\_de\\_la\\_leche\\_de\\_cabra\\_y\\_factores\\_nutricionales\\_que\\_afectan\\_el\\_contenido\\_de\\_sus\\_componentes](http://www.academia.edu/8060655/Composicion_de_la_leche_de_cabra_y_factores_nutricionales_que_afectan_el_contenido_de_sus_componentes)

Biblioteca Virtual en Salud- OPS/OMS Uruguay. (2016). *Salmonella*. Recuperado el 06 de enero de 2016 de <http://www.bvsops.org.uy/pdf/salmonella.pdf>

Biblioteca Virtual en Salud- OPS/OMS Uruguay. (2016). *Shigella*. Recuperado el 24 de abril del 2016 de <http://www.bvsops.org.uy/pdf/shigella.pdf>

bioMérieux. (2016). api®. Recuperado el 07 de enero de 2016 de <http://jornades.uab.cat/worksho pmrama/sites/jornades.uab.cat.worksho pmrama/files/API.pdf>

Bordeanu, A., Krupaci, F., Kiss, T. y Spinu, M. (2005). STUDY OF SEASONAL DYNAMICS IN RESPIRATORY MICROBIAL FLORA IN EXTENSIVELY RAISED GOATS. Recuperado el 13 de mayo del 2016 de [http://veterinarymedicinejournal.usamv.ro/pdf/vol.LVIII\\_4/Art5.pdf](http://veterinarymedicinejournal.usamv.ro/pdf/vol.LVIII_4/Art5.pdf)

Bourabah, A., Ayad, A., Boukraa, L., Hammoudi, S. y Benbarek, H. (2013). Prevalence and Etiology of Subclinical Mastitis in Goats of the Tiaret Region, Algeria. *Global veterinaria*. 11(5), pp. 604-608 doi: 10.5829/idosi.gv.2013.11.5.8112

Callejo, A. (2010). BREVE INTRODUCCIÓN A LA ANATOMÍA DE LA UBRE Y LA FISIOLÓGÍA DEL ORDENO. Recuperado el 06 de enero de 2016 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](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)

Calvo, J. (2009). CONTROL DE ENFERMEDADES DE POST COSECHA EN PRODUCTOS FRUTIHORTÍCOLAS MEDIANTE CONSORCIOS MICROBIANOS. Recuperado el 13 de mayo del 2016 de <http://www0.unsl.edu.ar/~webseu/memoria2009.pdf>

Carter, G.R. (1989). FUNDAMENTOS DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA VETERINARIA. Zaragoza, España: Acribia, S.A.

- Cervantes, L., Chalte, A. y Tapia, K. (2008). Capacitación para el servicio de alimentación ENFERMEDADES TRASMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAs). Recuperado el 13 de enero de 2016 de [http://basica.sep.gob.mx/tiempocompleto/pdf/alimentacion/ETAs\\_SEP\\_2008.pdf](http://basica.sep.gob.mx/tiempocompleto/pdf/alimentacion/ETAs_SEP_2008.pdf)
- Chacón, A. (2005). ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA LECHE DE CABRA (*Capra hircus*) Y SUS VARIACIONES EN EL PROCESO AGROINDUSTRIAL. *AGRONOMÍA MESOAMERICANA*, N° 16(2), 239-252.
- Charbek, E. (2015). Providencia Infections Treatment & Management. *MedScape Magazine*. Recuperado el 09 de mayo del 2016 de <http://emedicine.medscape.com/article/226541-treatment>
- Devlin, T. (2004). *Bioquímica libro de textos con aplicaciones clínicas*. (4.ªed.). Barcelona, España: EDITORIAL REVERTÉ S.A.
- DIBICO S.A.. (2016). CALDO ROJO DE FENOL CON ARABINOSA. Recuperado el 22 de abril del 2016 de <http://www.dibico.com/fichast/1129.pdf>
- Domínguez, A. (2012). Galería API 20E (Sistemas de identificación multipruebas). Recuperado el 07 de enero de 2016 de <http://perso.wanadoo.es/microdominguez/API.htm>
- Dossi, M., Escalona, M., Serrano, C., Silva, M., Juliet, M., Fernández, A., Leiva, V. y Fernández, J. (2002). *Serratia marcescens*: Descripción de un brote de infección intrahospitalaria. *Revista chilena de infectología*. 19(4) pp. 262-266.
- es-climate-data.org. (2015). CLIMA: QUITO. Recuperado el 29 de noviembre de 2015 de <http://es.climate-data.org/location/1012/>
- Fernández, A., García, c., Sáez, J. y Valdezate, S. (2016). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Recuperado el 22 de abril del 2016 de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimiento-smicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>



- Fernando, G. (2013). LACTACIÓN DE LA CABRA Y LOS FACTORES QUE LA REGULAN. Recuperado el 06 de enero de 2016 de <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/3770/02-1990-04.pdf?sequence=1>
- Font, G., Paz, R., Pece, N. y Belgrano, S. (2012). Composición físico-química y calidad microbiológica de la leche de cabra en rebaño bajo sistema extensivo en Santiago del Estero (Argentina). Recuperado el 01 de octubre de 2015 de <http://www.agro.unlp.edu.ar/revista/index.php/revagro/article/view/65>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION. Recuperado el 23 de octubre de 2015 de <http://faostat3.fao.org/download/Q/QA/E>
- García, A., Rivero, J., Gonzáles, P., Valero-Leal, K., Izquierdo, P., García, A. y Colmenares, C. (2009). Calidad bacteriológica de la leche cruda de cabra producida en la parroquia Faría, municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ*. 26(1) pp.
- Gianotti, S. (1999). Microbiology and Biochemistry of the Enterobacteriaceae Flora of the Surface of Typical Swiss Cheeses. Recuperado el 09 de mayo del 2016 de <http://e-collection.library.ethz.ch/eserv/eth:23477/eth-23477-02.pdf>
- Goenaga, M., Morán, J., Carrera, J., Garde, C. y Millet, M. (2001). Bacteriemia por *Providencia rettgeri*. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 19(6), párr. 1-6.
- Goldberg, M. (2013). Shigella infection: Epidemiology, microbiology, and pathogenesis. Recuperado el 14 de enero de 2016 de [http://www.uptodate.com/contents/shigella-infection-epidemiology-microbiology-and-pathogenesis?source=search\\_result&search=shigelosis&selectedTitle=4~130](http://www.uptodate.com/contents/shigella-infection-epidemiology-microbiology-and-pathogenesis?source=search_result&search=shigelosis&selectedTitle=4~130)
- Gómez, F. (2010). Leche de oveja 100 gr. de porción comestible. Recuperado el 10 de abril de 2016 de

<http://i2.wp.com/www.gestionagroganadera.com/wp-content/uploads/2014/08/Captura-de-pantalla-2014-08-18-a-las-17.14.28.png>

- Grant, M. (2016). *Jubb, Kennedy and Palmer's Patology of Domestic Animals*. (6.<sup>a</sup> ed.). Ontario, Canada: ELSEVIER.
- Guerrant, R. y Bobak, D. (1991). Bacterial and Protozoal Gastroenteritis. *The New England Journal of Medicine*. 325(5) p. 327 doi 10.1056/NEJM199108013250506
- Gutiérrez-Chávez, A., Martínez-Ortega, E., Valencia-Posadas, M., León-Galván, M., de la Fuente-Salcido, N., Bideshi, D. y Barboza-Corona, K. (Enero,2016). Potential use of *Bacillus thuringiensis* bacteriocins to control antibiotic-resistant bacteria associated with mastitis in dairy goats. Recuperado el 09 de mayo del 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26022411>
- Heer, G. (2007). MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE. Recuperado el 10 de abril del 2016 de <http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/tecnologialeche/informacion/microbiologia.pdf>
- Herrera, M., Vargas, A. y Herrera, J. (2000). Primeras identificaciones de *Rahnella aquatilis* en Costa Rica. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*. 35(1-2).
- Hill, R., Wise, G. y Anderson, M. (2006). *Fisiología Animal*. Madrid, España: EDITORIAL PANAMERICANA S.A.
- Instituto Nacional de Salud- República de Colombia. (2011). IDENTIFICACIÓN DE RIESGOS BIOLÓGICOS ASOCIADOS AL CONSUMO DE LECHE CRUDA EN COLOMBIA. Recuperado el 06 de abril de 2016 de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-peligros-biologicos-en-leche.pdf>
- Iowa State University. (2010). *E. coli* enterohemorrágica. Recuperado el 06 de abril de 2016 de [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/ecoli\\_enterohemorrhagica.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/ecoli_enterohemorrhagica.pdf)

- Kishore, J. (2012). Isolation, identification & characterization of *Proteus penneri* - a missed rare pathogen. *Indian Journal of Medical Research (IJMR)*. 135(3) pp. 341-345. Recuperado el 24 de abril del 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3361870/>
- Koneman, E., Winn, W., Allen, S., Procop, G., Janda, W. y Woods, G. (2006). *Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas en color*. Madrid, España: EDITORIAL MEDICA panamericana.
- Koneman, E., Winn, W., Allen, S., Procop, G., Janda, W. y Woods, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas en color*. [versión electrónica]. Recuperado el 23 de abril del 2016 de <https://books.google.com.ec/books?id=jyVQueKro88C&pg=PA211&lpg=PA211&dq=produccion+de+sulfuro+de+hidrogeno+en+medios&source=bl&ots=5OLd04aOlz&sig=XLv kf5DYE3hyfO82Cxq8EaMX8zc&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjR6ObG16XMAhWBPz4KHR1YDAIQ6AEIlzAB#v=onepage&q=El%20tiosulfato%20de%20sodio%20es%20la%20principal%20fuente%20de%20azufre&f=false>
- Laboratorios Britania S.A.. (2016). Discos de oxidasa. Recuperado el 23 de abril del 2016 de [http://www.britanialab.com/productos/195\\_inserto\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/195_inserto_es.pdf)
- Laboratorios Britania S.A.. (2016). Hektoen Entérico Agar. Recuperado el 23 de abril del 2016 de [http://www.britanialab.com/productos/241\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/241_hoja_tecnica_es.pdf)
- Laboratorios Britania S.A.. (2016). Lisina Hierro Agar. Recuperado el 22 de abril del 2016 de <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/lisinahierroagar.htm>.
- Laboratorios Britania S.A.. (2016). TSI Agar. Recuperado el 23 de abril del 2016 de <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/tsiagar.htm>
- LIVEXLAB®. (2016). TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO MANUAL DE PROCEDIMIENTOS. Recuperado el 28 de noviembre de 2015 de <http://www.livex.com.ec/uploads/documentos/Manual%20de%20Toma%20de%20muestras.pdf>

- Lopardo, H., Predari, S. y Vay, C. (2016). MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA VOLUMEN I Bacterias de Importancia Clínica. Recuperado el 13 de mayo del 2016 de <http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>
- López, J. (2011). Microbiología de la producción de hidrógeno. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*. 8(2), pp. 201-204. Recuperado el 23 de abril del 2016 de [http://reuredc.uca.es/index.php/tavira/article/viewFile/97/pdf\\_23](http://reuredc.uca.es/index.php/tavira/article/viewFile/97/pdf_23)
- López-Álvarez, J. (2016). ESCHERICHIA COLI: MECANISMOS DE PATOGENICIDAD. Recuperado el 06 de abril de 2016 de <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CV1v1c01.pdf>
- Ludeña, F., Peralta, S. y Arroyo, O. (2006). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la leche de cabra y su conservación mediante la activación del sistema lactoperoxidasa. Recuperado el 01 de octubre de 2015 de [http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?pid=S1817-83912006000100004&script=sci\\_arttext](http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?pid=S1817-83912006000100004&script=sci_arttext)
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. [versión electrónica]. Recuperado el 22 de abril del 2016 de <https://books.google.com.ec/books?id=FYWSzy7EjR0C&pg=PA55&lpg=PA55&dq=L-arabinosa+prueba&source=bl&ots=RNPjH9Qt&sig=GbsNZ0YLrVbb9n7-EF02j8gO6xE&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiHwcH64aPMAhWLDsAKHaMTDfEQ6AEIQzAH#v=onepage&q=L-arabinosa%20prueba&f=false>
- Magariños, H. (2000). PRODUCCIÓN HIGIÉNICA DE LA LECHE CRUDA. Recuperado el 10 de abril de 2016 de <http://portal.oas.org/LinkClick.aspx?fileticket=wlyuTwR3IEc%3D&tabid=585>

- Malcata, X. (2010). Critical Issues Affecting the Future of Dairy Industry: Individual Contributions in the Scope of a Global Approach. *Journal of Dairy Science*. 82(8), pp. 1595-1611.
- Manganello, S., Tayara, A., Perazzi, B., Neira, L., Famiglietti, A., Pugliese, L., Santini, P. y Vay, C. (enero, 2001). Caracterización y distribución de especies de Citrobacter en un hospital universitario. ELSEVIER, N° 01(19), 20.
- Manganello, S., Tayara, A., Perazzi, B., Neira, L., Famiglietti, A., a, Pugliese, L., Santini, P. y Vay, C. (enero, 2001). Caracterización y distribución de especies de Citrobacter en un hospital universitario. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 19(01) pp. 10-16.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A. y Maguire, D. (2013). *CLINICAL VETERINARY MICROBIOLOGY*. (2.<sup>a</sup> ed.). Toronto, Canadá: MOSBY ELSEVIER
- Martín del Campo, M., Gómez, H. y Alaníz, R. (2008). BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA Y ACTIVIDAD BACTERIOCINOGENICA AISLADAS DE QUESOS FRESCOS. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 6(5) pp. 1-5. Recuperado el 10 de abril de 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73011197005>
- Martín, L., Patón, D., Rota, A., Rojas, A. y Tovar, J. (Marzo, 1994). Producción de leche en los caprinos Algunos factores condicionantes. *MUNDO GANADERO*, 46.
- MCD LAB®. (2016). ESPECIFICACIONES AGAR SALMONELLA SHIGELLA. Recuperado el 23 de abril del 2016 de <http://electronic-systems.com.mx/pdf/AGAR%20SALMONELLA%20SHIGELLA.pdf>
- McMurry University. (2014). VUMIE 2012 VIRTUAL UNKNOWN (THE MICROBIOLOGY INTERNET EDITION) Arginine Dihydrolase Test. Recuperado el 22 de abril del 2016 de [http://www.vumicro.com/vumie/help/vumicro/Arginine\\_dihydrolase\\_Test.htm](http://www.vumicro.com/vumie/help/vumicro/Arginine_dihydrolase_Test.htm)

- Merino, L. y Lösch, L. (2016). FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE. Recuperado el 05 de enero de 2016 de <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE%20Enterobacterias.pdf>
- Molina, J. y Uribarren, T. (2015). Universidad Nacional Autónoma de México Departamento de Microbiología y Parasitología- Recursos de Bacteriología. INFECCIONES POR SHIGELLA SPP. Recuperado el 05 de enero de 2016 de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/shigella.html>
- Moya, N., Lieva, C., Voza, L., Fedullo, A., Ortega, E., Nobila, C. y Maurizio, M. (2016). RAHNELLA AQUATILIS: BACTERIEMIA EN UN LACTANTE. Recuperado el 13 de mayo del 2016 de <http://www.sap.org.ar/docs/congresos/2014/resumenesTrabajosLibres.pdf>
- Ochoa, E., Vega, L., Ochoa, M., Bisset, P. y Torres, G. (2009). CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LA LECHE DE OVEJAS RAMBOUILLET BAJO MANEJO INTENSIVO. 19(2) párr. 5-6. Recuperado el 10 de abril del 2016 de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592009000200014](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000200014)
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2016). Brucelosis. Recuerado el 10 de abril de 2016 de <http://www.oie.int/doc/ged/D13939.PDF>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2008). Manual de la OIE sobre animales terrestres. CAPÍTULO 2.9.9. SALMONELOSIS\*. Recuperado el 24 de abril del 2016 de [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.09.09.%20Salmonellosis.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.09.%20Salmonellosis.pdf)
- Organización Mundial para el Control de la Mastitis y la Calidad de Leche. (2010). Preguntas sobre la calidad de la leche. Recuperado el 28 de noviembre de 2015 de <http://www.nmconline.org/transl/elLecheroSampling.pdf>.

- Organización Panamericana de la Salud. (2016). Diarrea causada por cepas de E. Coli enterotoxigénicas (cie- 10 a04.1). Recuperado el 06 de abril de 2016 de <http://new.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2s.html>
- Organización Panamericana de la Salud. (2016). Klebsiella. Recuperado el 25 de abril de 2016 de [http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs\\_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Klebsiella.pdf](http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Klebsiella.pdf)
- Patiño, S., Rodríguez, L., Alarcon, T. y Abitbol, M. (julio, 2005). INFECCIÓN POR SERRATIA MARCESCENS: CASO CLÍNICO. Revista de Postgrado de la cátedra de Medicina, N° 147(8), 16-17.
- Perin, L. y Nero, L. (diciembre, 2014). Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. *BMC Microbiology*. 14(36), p. 2. Recuperado el 10 de abril de 2016 de <http://link.springer.com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/journal/12866>
- Plumb, D. (2010). *Manual de farmacología veterinaria*. (6.ª ed.). Buenos Aires, Argentina: INTER-médica.
- Poulsen, K., Hutchins, F., McNulty, C., Tremblay, M., Zabala, C., Barragan, V., Lopez, L., Trueba, G. y Bethel, J. (2013). Brucellosis in Dairy Cattle and Goats in Northern Ecuador. Recuperado el 29 de junio del 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3973517/>
- Public Health Agency of Canada. (2011). PROTEUS SPP. PATHOGEN SAFETY DATA SHEET - INFECTIOUS SUBSTANCES. Recuperado el 24 de abril del 2016 de <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/proteus-eng.php>
- Public Health Agency of Canada. (2016). CITROBACTER SPP.. Recuperado el 25 de abril del 2016 de <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/citrobacter-eng.php>
- Puerta-García, A. y Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. Recuperado el 05 de enero de 2016 de

[http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias\\_Medicine2010.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf)

- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T., Ross, P., Fitzgerald, G. y Cotter, P. (septiembre, 2013). The complex microbiota of raw milk. *Magazine of federation of european microbiological societies*. 13(24) doi: <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12030>
- Ramírez, J., Contreras, G. y Gómez, M. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47(3-4) p. 92. Recuperado el 24 de abril del 2016 de [http://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2005/mi05-3\\_4f.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2005/mi05-3_4f.pdf)
- Recinto Universitario de Mayagüez. (2016). NUTRIENTES Y GASES: AZUFRE. Recuperado el 23 de abril del 2016 de <http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p3-azufre.pdf>
- Revilla, A. (1996). *Tecnología de la leche*. [versión electrónica]. Recuperado el 10 de abril del 2016 de <https://books.google.com.ec/books?id=miAPAQAIAAJ&pg=PA59&lpg=PA59&dq=bacterias+saprofiticas+de+leche&source=bl&ots=JYFqapH049&sig=eO1shrYiOQ1nSyJ4KmTdMCPXows&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiN5aP-7ITMAhVDGR4KHTWmBsEQ6AEINjAF#v=onepage&q=bacterias%20saprofiticas%20de%20leche&f=false>
- Rodriguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Recuperado el 06 de abril de 2016 de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342002000500011](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011)
- Rolón, M., Castells, M., Sarquis, S., Rodríguez, G. y Epifane, M. (2013). EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA Y FÍSICO-QUÍMICA DE LECHE Y QUESOS DE CABRA, OVEJA, BÚFALA EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES. Recuperado el 01 de octubre de 2015 de <http://www.inti.gob.ar/tecointi2013/CD/info/pdf/389.pdf>



- Ruiz, R., Cervantes, R., Ducoing, A., Hernández, L., Martínez, D. (2013). Principales géneros bacterianos aislados de leche de cabra en dos granjas del municipio de Tequisquiapan, Querétaro, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 4(1), p. 99.
- Ruocco, G., Fiusa, J., Alallón, W. y Salveraglio, C. (2010). Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's). Recuperado el 13 de enero de 2016 de <http://www.bvsops.org.uy/pdf/etas.pdf>.
- Saad, N., Sabreen, M., Amin, W. y Gendi, M. (2012). Prevalence of *Escherichia albertii* and Other *Escherichia* species in Raw Milk and Some Dairy Products in Assiut City, Egypt. *Journal of American Sciencies*. 8(11), p. 333.
- Sahl, J., Morris, C., Emberger, J., Fraser, C., Ochieng, J., Juma, J., Fields, B., Breiman, R., Gilmour, M., Nataro, J. y Rasko, D. (2015). Defining the Phylogenomics of *Shigella* Species: a Pathway to Diagnostics. *Journal of Clinic Microbiology*. 53(3) pp. 951-960. Recuperado el 24 de abril del 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4390639/>
- Scanlan, Ch. M. (1991). Introducción a la bacteriología veterinaria. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
- Servicio Ecuatoriano de Normalización- INEN. (2013). Censo Total Nacional Caprino 2013. Quito, Ecuador.
- Sharlab®. (2016). PRODUCTOS PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y PRUEBAS PARA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN. Recuperado el 23 de abril del 2016 de <http://www.cienytech.com/catalogos/Microbiologia/Pbioquimicas.pdf>
- Stanchi, N. (2007). Enterobacterias. Martino, E., Gentilini, E., Reinoso, E., Echeverría, M., Leardini, N. y Copes, J. (Eds). *Microbiología Veterinaria*. (pp. 95, 97, 98, 100 y 101). Buenos Aires, Argentina: INTER-Médica.
- Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M. y Painter, P. (2005). MICROBIOLOGÍA. (2.ª ed.). Barcelona, España: EDITORIAL REVERTÉ, S.A.
- Sticotti, E., Giraudo, J., Mació, M., Bérnago, E., Schneider, M., Magnano, G. y Macias, A. (2013). AGENTES BACTERIANOS PRESENTES EN

LECHE DE CABRAS CON MASTITIS CLÍNICAS EN SISTEMAS DE CRÍA EXTENSIVOS. Recuperado el 02 de abril de 2016 de [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_caprina/leche\\_caprina/44-bacterianos\\_mastitis.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_caprina/leche_caprina/44-bacterianos_mastitis.pdf)

Terragno, R., Caffer, M. y Binsztein, N. (2007). Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Shigella* spp.. Recuperado el 24 de abril del 2016 de [http://bvs.panalimentos.org/local/File/Manual\\_Shigella\\_procedimientos.pdf](http://bvs.panalimentos.org/local/File/Manual_Shigella_procedimientos.pdf)

The National Research Council (NRC). (1968). Recommended daily dietary allowances Food & Nutr. Board. Revista National Academy of Sciences, N° 20(8), 200.

Trindade, E., Damasceno, da Gama Pantoja, L., de Figueredo, H., da Silva, L. y da Cruz Rodriguez, A. (2015). Microbiota of two species of commercially important fish in the Amazon region (Belém-Pará-Brazil): Butterfly peacock bass (*Cichla ocellaris*) and piramutaba (*Brachyplatystoma vailantii*). *African Journal of Microbiology Research*. 9(9), pp. 572-580.

U.S Department of Health and Human Services. (2015). Los peligros de la leche cruda: La Leche sin Pasteurizar Puede Representar un Riesgo Grave para la Salud. Recuperado el 14 de enero de 2016 de <http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/Consumers/ucm210577.htm>

U.S Department of Health and Human Services. (2014). 14 patógenos principales transmitidos por los alimentos. Recuperado el 10 de abril del 2016 de <http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/HealthEducators/ucm091976.htm>

Unión Ganadera Regional de Jalisco. (2016). Representación de la estructura interna de la glándula mamaria. Recuperada de <http://www.ugrj.org.mx/images/contenido/cipej/baccock/esquema.gif>

- Unión Ganadera Regional de Jalisco. (2016). Representación de la estructura interna del pezón. Recuperada de <http://www.ugrj.org.mx/images/contenido/cipej/bacock/estructura.gif>
- Universidad de Castilla- La Mancha. (2016). Anatomía comparada de la Glándula Mamaria de las principales especies de interés zootécnico. Recuperado el 06 de enero del 2016 de <https://www.uclm.es/profesorado/produccionanimal/PMP/Vacuno/GM.pdf>
- Universidad de Chile. (2004). Recursos farmacológicos en producción animal [ Hormonas u hormonomiméticos ]. Recuperado el 07 de enero de 2016 de [http://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon\\_vet\\_simple/0,1420,SCID%253D9181%2526ISID%253D451%2526PRT%253D9172,00.html](http://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_simple/0,1420,SCID%253D9181%2526ISID%253D451%2526PRT%253D9172,00.html)
- Universidad de Córdoba. (2016). El sector caprino a nivel mundial. Recuperado el 29 de junio del 2016 de [http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/12\\_10\\_07\\_Tema\\_31\\_1.pdf](http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/12_10_07_Tema_31_1.pdf)
- Universidad de Granada. (2016). Prueba de la reducción de nitrito a nitratos. Recuperado el 23 de abril del 2016 de [http://www.ugr.es/~pomif/pombac/pb-v/pb-v-3-reduccion\\_nitratos\\_nitritos.htm](http://www.ugr.es/~pomif/pombac/pb-v/pb-v-3-reduccion_nitratos_nitritos.htm)
- Universidad Nacional Autónoma de México. (2016). MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Subdirección Académica Área de Docencia de Salud Pública. Recuperado el 24 de noviembre de 2015 de [http://veterinaria.uaemex.mx/\\_docs/607\\_970\\_MP%20Bacteriolog%C3%ADa%20y%20Micolog%C3%ADa.pdf](http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/607_970_MP%20Bacteriolog%C3%ADa%20y%20Micolog%C3%ADa.pdf)
- Universidad Nacional Autónoma de México. (2016). PROYECTO DE DETECCIÓN DE MASTITIS EN LOS CEIE. Recuperado el 03 de abril de 2016 de

<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/secretarias/medicina/medicina/MASTITIS.pdf>

- Urroz, C. (1991). *ELEMENTOS DE ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA ANIMAL*. [versión electrónica]. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=K25RmJ28OCQC&pg=PA232&pg=PA232&dq=anatomia+glandula+mamaria+cabras&source=bl&ots=bC5uEC5LQh&sig=Mq1zpYtWg5QefTaA88dlhwa7aJA&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiv872XvtfLAhXL0h4KHZdyAcYQ6AEIUDAL#v=onepage&q=anatomia%20glandula%20mamaria%20cabras&f=false>
- Vázquez-Ojeda, E., Pérez-Morales, E., Hurtado-Ayala, L. y Alcántara Jurado, L. (2014). Evaluación de la calidad microbiológica de la leche Revisión Sistemática de 2003 a 2013. Recuperado el 06 de abril de 2016 de <http://reibci.org/publicados/2014/agosto/3300103.pdf>
- Vidal-Graniel, J. (2003). Escherichia coli enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 9(1), 188-193. Recuperado el 06 de abril de 2016 de <http://www.redalyc.org/pdf/487/48709108.pdf>
- Villegas, G., Bolaños, A. y Olguín, L. (1986). *LA GANADERÍA EN MÉXICO*. [versión electrónica]. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=sSStWiHmsy4C&pg=PA95&lpg=PA95&dq=Arbiza,+1986>
- Zabala, C. (2013). Identificación de la Presencia de Brucella en Cabras en la Zona Urbana de Quito. Recuperado el 24 de octubre de 2015 de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/2094/1/106849.pdf>
- Zabaleta, M. (2011). MICROORGANISMOS AISLADOS DE LECHE DE CABRAS SANAS Y CON MASTITIS. Recuperado el 02 de abril de 2016 de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3239/SELENE%20MARIA%20ZAVALETA%20MU%C3%91IZ.pdf?sequence=1>
- Zaldivar, I. y Cornejo, R. (2011). APÉNDICE G Identificación bioquímica de enterobacterias por el sistema API 20E. Recuperado el 29 de

noviembre de 2015 de  
[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/API20E\\_18841.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/API20E_18841.pdf)

## **ANEXOS**

Anexo 1. Encuesta para los pequeños productores que expenden leche cruda de cabras a orillas de las calles en el sur de la ciudad de Quito.

## ENCUESTA A PEQUEÑOS GANADEROS CAPRINOS EN EL SUR DE LA CIUDAD DE QUITO

1. ¿Específicamente cuántos caprinos (hembras) posee usted?.

de 1 a 5  de 6 a 10  de 11 a 15  de 16 a 20  más de 20

2. ¿Cuántas de ellas utiliza para expender leche?.

de 1 a 5  de 6 a 10  de 11 a 15  de 16 a 20  más de 20

3. ¿Cuánta leche (en litros) produce al día por cada animal?.

\_\_\_\_\_ litros

4. ¿Cuánta leche (en litros) vende al día?.

de 1 a 3  de 4 a 6  de 7 a 9  más de 10

5. ¿De la leche producida, separa alguna cantidad para consumo propio?.

Si

No

5.1 ¿Cuánto en litros?.

\_\_\_\_\_ litros

6. ¿A parte de las cabras, tiene otros animales?.

Si

No

5.1 Si la respuesta es "Si", ¿Cuántos y cuáles?.

---

---

Anexo 2. Encuesta realizada a los posibles consumidores de leche caprina en el sur de la ciudad de Quito.

## **ENCUESTA A POSIBLES CONSUMIDORES DE LECHE CAPRINA EN EL SUR DE LA CIUDAD DE QUITO**

### **1. ¿Usted consume leche de cabras?.**

Si

No

#### **1.1 ¿Por qué?**

---

### **2. ¿Con qué frecuencia consume la leche?.**

- 1 vez a la semana
- Más de 1 vez a la semana
- 1 vez cada 2 semanas
- 1 vez al mes
- Cuando se enferma

### **3. ¿Dónde adquiere el producto?**

- En un supermercado
- En una tienda
- Tiene cabras
- En la carretera

#### **3.1 Si el producto es comprado a orillas de las carreteras ¿hierva la leche antes de consumirla?.**

Si

No

##### **3.1.1 ¿Por qué?**

---





**STORAGE CONDITIONS**

The strips are supplied in an aluminum pouch with desiccant sachets.

Once opened (\*), the pouch should be re-sealed using the clip seal (included in the kit) to preserve the remaining strips with the desiccant sachets : place the open end of the pouch along the seal and carefully clamp between the two parts. The strips may then be kept for up to **10 months after the pouch has been opened**, at 2-8°C (or until the expiration date indicated on the packaging, if this comes before).

(\*) *Recommended method for opening the pouches* : cut open the pouch just below the seal while holding the pouch upright, in order to avoid damaging the desiccant sachets.

**SPECIMENS (COLLECTION AND PREPARATION)**

API 20 E is not for use directly with clinical or other specimens.

The microorganisms to be identified must first be isolated on a culture medium adapted to the culture of *Enterobacteriaceae* and/or non-fastidious Gram-negative rods, according to standard microbiological techniques.

**INSTRUCTIONS FOR USE****Oxidase test**

The oxidase test must be performed according to the manufacturer's instructions for use. The result should be recorded on the result sheet as it is an integral part of the final profile (21st identification test).

**Preparation of the strip**

- Prepare an incubation box (tray and lid) and distribute about 5 ml of distilled water or demineralized water [or any water without additives or chemicals which may release gases (e.g., Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etc.)] into the honey-combed wells of the tray to create a humid atmosphere.
- Record the strain reference on the elongated flap of the tray. (Do not record the reference on the lid as it may be misplaced during the procedure.)
- Remove the strip from its packaging.
- Place the strip in the incubation box.

**NOTE** : API 20 E should only be used with *Enterobacteriaceae* and/or non-fastidious Gram-negative rods. Fastidious organisms having demanding nutritional requirements and requiring appropriate handling precautions (i.e., *Brucella* and *Francisella*) are not included in the API 20 E database. Alternative procedures must be used to exclude or confirm their presence.

**Preparation of the inoculum**

- Open an ampule of API NaCl 0.85 % Medium (5 ml) or an ampule of API Suspension Medium (5 ml) as indicated in the paragraph "Warnings and Precautions" of the package insert for these products, or use any tube containing 5 ml of sterile saline or sterile distilled water, without additives.
- Using a pipette or PSIpette, remove a single well-isolated colony from an isolation plate. It is recommended to use young cultures (18-24 hours old).
- Carefully emulsify to achieve a homogeneous bacterial suspension.  
This suspension must be used immediately after preparation.

**NOTE** : most *Vibrio* species are halophilous. If a *Vibrio* is suspected, suspend the bacteria in API NaCl 0.85 % Medium.

**Inoculation of the strip**

- Using the same pipette, fill both tube and cupule of the tests [CIT], [VP] and [GEL] with the bacterial suspension.
- Fill only the tube (and not the cupule) of the other tests.
- Create anaerobiosis in the tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S and URE by overlaying with mineral oil.
- Close the incubation box.
- Incubate at 36°C ± 2°C for 18-24 hours.

**READING AND INTERPRETATION****Reading the strip**

- After the incubation period, read the strip by referring to the Reading Table.
- If 3 or more tests (GLU test + or -) are positive, record all the spontaneous reactions on the result sheet and then reveal the tests which require the addition of reagents :
  - TDA Test : add 1 drop of TDA reagent. A **reddish brown** color indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet.
  - IND Test : add 1 drop of JAMES reagent. A **pink** color developed in the whole cupule indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet.
  - VP Test : add 1 drop each of VP 1 and VP 2 reagents. Wait at least 10 minutes. A **pink** or **red** color indicates a **positive** reaction to be recorded on the result sheet. If a **slightly pink** color appears after 10 minutes, the reaction should be considered **negative**.

**NOTE** : The indole production test must be performed last since this reaction releases gaseous products which interfere with the interpretation of other tests on the strip. The plastic incubation lid should not be replaced after the addition of the reagent.

- If the number of positive tests (including the GLU test) before adding the reagents is less than 3 :
  - Reincubate the strip for a further 24 hours (± 2 hours) without adding any reagents.
  - Reveal the tests requiring the addition of reagents (see previous paragraph).
  - To complete the identification, it may be necessary to perform supplementary tests (refer to Identification paragraph).

**Interpretation**

Identification is obtained with the **numerical profile**.

- Determination of the numerical profile :  
On the result sheet, the tests are separated into groups of 3 and a value 1, 2 or 4 is indicated for each. By adding together the values corresponding to positive reactions within each group, a 7-digit profile number is obtained for the 20 tests of the API 20 E strip. The oxidase reaction constitutes the 21st test and has a value of 4 if it is positive.
- Identification :  
This is performed using the database (V4.0)
  - \* with the Analytical Profile Index :
    - Look up the numerical profile in the list of profiles.
  - \* with the identification software :
    - Enter the 7-digit numerical profile manually via the keyboard.

## Continuación de Anexo 3.

api® 20 E

07584D - GB - 2002/10

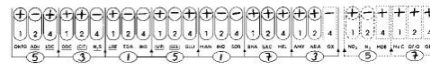
In some cases, the 7-digit profile is not discriminatory enough and the following supplementary tests need to be carried out :

- Reduction of nitrates to nitrites (NO<sub>2</sub>) and N<sub>2</sub> gas (N<sub>2</sub>) : add 1 drop each of NIT 1 and NIT 2 reagents to the GLU tube. Wait 2 to 5 minutes. A **red** color indicates a **positive** reaction (NO<sub>2</sub>). A negative reaction (yellow) may be due to the reduction to nitrogen (as sometimes evidenced by gas bubbles) : add 2 to 3 mg of Zn reagent to the GLU tube. After 5 minutes, if the tube remains **yellow** this indicates a **positive** reaction (N<sub>2</sub>) to be recorded on the result sheet. If the test turns **orange-red**, this is a **negative** reaction : the nitrates still present in the tube have been reduced by the Zinc. This reaction is useful when testing Gram-negative, oxidase positive rods.

**NOTE** : For the same reason as the indole test (see the note in the paragraph "Reading the strip"), the nitrate reduction test must be performed last.

- Motility (MOB) : Inoculate an ampule of API M Medium (see package insert).
- Growth on MacConkey agar medium (McC) : Streak a MacConkey agar plate (see package insert).
- Oxidation of glucose (OF-O) : Inoculate an ampule of API OF Medium (see package insert).
- Fermentation of glucose (OF-F) : Inoculate an ampule of API OF Medium (see package insert).

These supplementary tests, indicated in the introduction section (Profile coding) of the Analytical Profile Index, may be used to form a 9-digit profile. Identification is then obtained using the identification software.



### 5 315 173 (57) *Enterobacter gergoviae*

Further tests may be proposed in case of low discrimination. Refer to the identification software or Analytical Profile Index.

### QUALITY CONTROL

The media, strips, and reagents are systematically quality controlled at various stages of their manufacture. For those users who wish to perform their own quality control tests with the strip, it is preferable to use the strain **1. *Escherichia coli* ATCC 25922** or else one of the following strains :

- |  |            |   |            |
|--|------------|---|------------|
| 2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | ATCC 51331 | 4. <i>Proteus mirabilis</i>                           | ATCC 35659 |
| 3. <i>Enterobacter cloacae</i>         | ATCC 13047 | 5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> | ATCC 35657 |

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VPR	LVP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> *	
1.	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
2.	+	-	V	-	V	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4.	-	-	+	+	V	+	+	+	-	-	-	V	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	+
5.	+	-	+	-	+	-	V	-	-	V	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

- \* The N<sub>2</sub> (+) state may be observed for the strain ATCC 13047 and the strain ATCC 25922.
- Profile obtained after 24-48 hours of incubation for the strain ATCC 51331, using colonies grown on Trypticase Soy agar + blood.
- Profiles obtained after 18-24 hours of incubation for the other strains, using colonies grown on Trypticase Soy agar + blood.
- Bacterial suspensions prepared in API NaCl 0.85 % Medium.

It is the responsibility of the user to perform Quality Control in accordance with any local applicable regulations.

### LIMITATIONS OF THE METHOD

- The API 20 E system is intended uniquely for the identification of *Enterobacteriaceae* and those non-fastidious, Gram-negative rods included in the database (see Identification Table at the end of this package insert). It cannot be used to identify any other microorganisms or to exclude their presence.
- Discrepancies with respect to conventional methods may be observed. They are due to the different principles of the reactions used in the API technique. In addition, substrate variations exist that also account for percentage differences.
- On rare occasions, the glucose reactions for organisms such as *Klebsiella* or *Proteus* may revert from positive to negative, in which instance a bluish-green color is seen. This reaction will be recorded as a negative reaction. Such occurrences are reflected in the percentages indicated in the Identification Table.
- If *Salmonella* or *Shigella* are identified, serological identification must be performed to confirm the bacterial identification.
- Only pure cultures of a single organism should be used.

### RANGE OF EXPECTED RESULTS

Consult the Identification Table at the end of this package insert for the range of expected results for the various biochemical reactions.

### PERFORMANCE

- *Enterobacteriaceae* :  
5514 collection strains and strains of various origins belonging to species included in the database were tested :  
- 92.80 % of the strains were correctly identified (with or without supplementary tests).  
- 4.61 % of the strains were not identified.  
- 2.59 % of the strains were misidentified.
- Other non-fastidious Gram-negative rods :  
2386 collection strains and strains of various origins belonging to species included in the database were tested :  
- 90.32 % of the strains were correctly identified (with or without supplementary tests).  
- 6.16 % of the strains were not identified.  
- 3.52 % of the strains were misidentified.

Continuación de Anexo 3.

apl® 20 E

07584D - GB - 2002/10

**WASTE DISPOSAL**

It is the responsibility of each laboratory to handle waste and effluents produced according to their type and degree of hazardousness and to treat and dispose of them (or have them treated and disposed of) in accordance with any applicable regulations.

**WARRANTY**

bioMérieux disclaims all warranties, express or implied, including any implied warranties of MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR USE. bioMérieux shall not be liable for any incidental or consequential damages. IN NO EVENT SHALL BIOMERIEUX'S LIABILITY TO CUSTOMER UNDER ANY CLAIM EXCEED A REFUND OF THE AMOUNT PAID TO BIOMERIEUX FOR THE PRODUCT OR SERVICE WHICH IS THE SUBJECT OF THE CLAIM.

**READING TABLE**

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.223	β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-βD-Galactopyranosidase)	colorless	yellow (1)
ADH	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	yellow	red / orange (2)
LDC	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
ODC	L-ornithine	1.9	Ornithine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
[CIT]	trisodium citrate	0.756	CITrate utilization	pale green / yellow	blue-green / blue (3)
H <sub>2</sub> S	sodium thiosulfate	0.075	H <sub>2</sub> S production	colorless / greyish	black deposit / thin line
URE	urea	0.76	UREase	yellow	red / orange (2)
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane DeAminase	TDA / immediate yellow                      reddish brown	
IND	L-tryptophane	0.19	INDole production	JAMES / immediate colorless                      pink pale green / yellow	
[VP]	sodium pyruvate	1.9	acetoin production (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min colorless                      pink / red (5)	
[GEL]	Gelatin (bovine origin)	0.6	GELatinase	no diffusion	diffusion of black pigment
GLU	D-glucose	1.9	fermentation / oxidation (GLUcose) (4)	blue / blue-green	yellow / greyish yellow
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation / oxidation (MANnitol) (4)	blue / blue-green	yellow
INO	inositol	1.9	fermentation / oxidation (INOsitol) (4)	blue / blue-green	yellow
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation / oxidation (SORbitol) (4)	blue / blue-green	yellow
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation / oxidation (RHAmnose) (4)	blue / blue-green	yellow
SAC	D-sucrose	1.9	fermentation / oxidation (SACcharose) (4)	blue / blue-green	yellow
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation / oxidation (MELibiose) (4)	blue / blue-green	yellow
AMY	amygdalin	0.57	fermentation / oxidation (AMYgdalin) (4)	blue / blue-green	yellow
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation / oxidation (ARAbinose) (4)	blue / blue-green	yellow
OX	(see oxidase test package insert)		cytochrome-OXidase	(see oxidase test package insert)	

- (1) A very pale yellow should also be considered positive.  
 (2) An orange color after 36-48 hours incubation must be considered negative.  
 (3) Reading made in the cupule (aerobic).  
 (4) Fermentation begins in the lower portion of the tubes, oxidation begins in the cupule.  
 (5) A slightly pink color after 10 minutes should be considered negative.  
 • The quantities indicated may be adjusted depending on the titer of the raw materials used.  
 • Certain cupules contain products of animal origin, notably peptones.

## Anexo 4. Instrucciones del test BETASTAR® COMBO: descripción y procedimiento del ensayo.

Tomado de NEOGEN® CORPORATION, 2012.

**BetaStar® Combo**

### ASSAY DESCRIPTION

BetaStar Combo is a rapid (5 minute) lateral flow assay for the visual detection of beta-lactam and tetracycline antibiotic residues in raw, commingled bovine milk.

The assay detects beta-lactams (amoxicillin, cloxacillin, oxacillin, ampicillin, penicillin G, dicloxacillin, nafcillin, cephalirin, cefalonium, cefoperazone, cefazolin, cefquinome, and ceftiofur) and tetracyclines (chlortetracycline, oxytetracycline, and tetracycline) at levels well below the maximum residue limit (MRL) established by the European Union Commission.



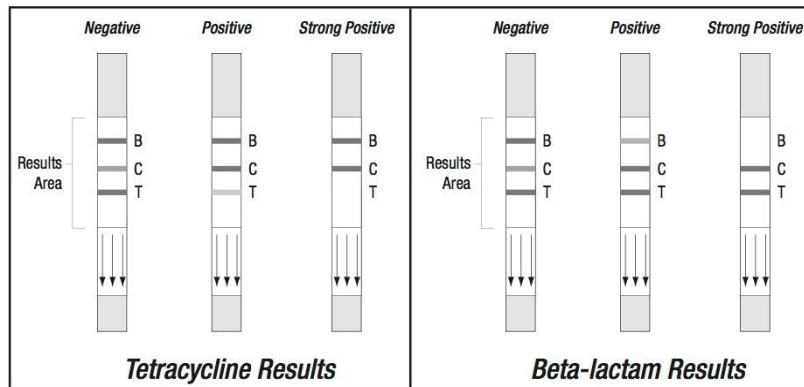
### MATERIALS AND METHODS

#### Milk collection

Raw, commingled bovine milk was obtained from a local dairy processing facility. The milk was kept at 2–8°C and used within 24 hours of collection. The milk was tested with the BetaStar Combo assay (Neogen item BKC002) according to the manufacturer's recommended procedure to ensure the detectable absence of beta-lactam and tetracycline residues.

#### Assay procedure

Drugged milk or negative milk (0.2 mL) was added to a BetaStar Combo reagent vial and quickly mixed by repeatedly tapping the vial until all reagent solids were in the solution. The vial then was placed into a heating block ( $47.5 \pm 1^\circ\text{C}$ ) for 2 minutes. At the completion of the 2 minute incubation, a BetaStar Combo device was placed into the vial and incubated ( $47.5 \pm 1^\circ\text{C}$ ) for 3 minutes. At the end of the 3 minute incubation, the device was removed from the vial and the signal intensities of the two antibiotic test lines were immediately compared to the intensity of the control line. If the signal intensity of a test line was less than or equal to the intensity of the control line, then the test was scored positive for the presence of the specific antibiotic. If the intensity of a test line was greater than the control line, the milk was scored negative for the presence of the antibiotic.



more ►

**ROBUSTNESS**

The interpretation of results was visual and reader based. The reader compares the control line intensity to the intensity of the test line and calculates a ratio. If the test line is less than or equal to the control line, the result is considered positive. If the test line is greater in intensity when compared to the control line, the result is considered negative. The following data set represents the robustness of the assay where milk spiked with ampicillin and tetracycline at different levels was observed visually and with the reader. These results were collected throughout three months with multiple users across 59 lots.

<b>BetaStar Combo kit performance robustness summary</b>						
	<b>Ampicillin</b>			<b>Tetracycline</b>		
	<b>0 ppb</b>	<b>2 ppb</b>	<b>4 ppb</b>	<b>0 ppb</b>	<b>50 ppb</b>	<b>100 ppb</b>
<b>Average ratio</b>	7.5	1.2	0.1	7.5	0.9	0.2
<b>Maximum ratio</b>	14.4	4.4	0.5	15.6	2.5	0.6
<b>Minimum ratio</b>	3.2	0.3	0.0	3.6	0.3	0.0

**ACCURACY**

To assess the accuracy of the assay, 10,915 independent tests were run across 59 lots of BetaStar Combo with milk verified to be free of beta-lactams and tetracyclines, with all tests returning a negative result. There were no false positive results, which reinforces BetaStar Combo's accuracy and trueness. For ampicillin, all results were negative at 0 ppb, fractional positives were noted at 2 ppb, and all results were positive at 4 ppb. For tetracycline, all results were negative at 0 ppb, fractional positives were noted at 50 ppb, and all results were positive at 100 ppb. Unlike other tests on the market, BetaStar Combo was shown to not exhibit false positive results.

**RESULTS AND CONCLUSIONS**

BetaStar Combo is a simple, rapid visual test for the detection of beta-lactams and tetracyclines in raw, commingled bovine milk that meets the strict standards of residue tolerance detection limits set forth by the European Union Commission.



**North America**

**Neogen Headquarters**

620 Leshar Place, Lansing, MI 48912 USA  
 800/234-5333 (USA/Canada) or 517/372-9200  
 Fax: 517/372-2006 • [foodsafety@neogen.com](mailto:foodsafety@neogen.com)  
[www.neogen.com](http://www.neogen.com)

**Europe, Middle East and Africa**

**Neogen Europe**

The Dairy School, Auchincruive, Ayr  
 KA6 5HW Scotland, UK  
 + 44 (0) 1292 525 600  
 Fax: + 44 (0) 1292 525 601  
[info\\_uk@neogeneurope.com](mailto:info_uk@neogeneurope.com)  
[www.neogeneurope.com](http://www.neogeneurope.com)

**Mexico**

**Neogen Latinoamérica**

Darwin No. 83, Col. Anzures, México, 11590 D.F.  
 (55) 5254-8235, (55) 5203-0111, (55) 5531-2837  
 Fax: (55) 5531-1647  
[informacion@neogenlac.com](mailto:informacion@neogenlac.com) • [www.neogen.com](http://www.neogen.com)

**Brazil**

**Neogen do Brasil**

Rua: Alberto Guizo 760, Distrito Industrial João Narezzi, Indaiatuba – SP Brasil, Cep: 13.347-402  
 Tel: +55 19 3935.3727  
[info@neogendobrasil.com.br](mailto:info@neogendobrasil.com.br) • [www.neogen.com](http://www.neogen.com)

Anexo 5. Instrucciones del test BETASTAR® COMBO: sensibilidad del test.  
Tomado de NEOGEN® CORPORATION, 2012.

**BetaStar® Combo**

#### TEST SENSITIVITY

The test sensitivity (in µg/kg) of the BetaStar Combo instrumental reading (AccuScan III) with a cutoff ratio is 1.0. The test capability is defined as the lowest concentration tested giving 19 positive results out of 20, 38 positive results out of 40, or 57 positive results out of 60.

Group	Substance	MRL (µg/kg)	Test sensitivity (µg/kg)	Number of positive results/number of testings
Penicillins	Penicillin G	4	4	59/60
	Ampicillin	4	4	58/60
	Amoxicillin	4	4	60/60
	Oxacillin	30	5	20/20
	Cloxacillin	30	5	20/20
	Dicloxacillin	30	6	20/20
	Nafcillin	30	12	19/20
	Penethamate	4	80	20/20
Cefalosporins	Ceftiofur	100	90	58/60
	Desfuroyl ceftiofur	100	1000	20/20
	Cefquinome	20	8	20/20
	Cefazolin	50	40	40/40
	Cephapirin	60	9	19/20
	Desacetyl cephalirin	60	3	20/20
	Cefacetile	125	40	20/20
	Cefoperazone	50	8	19/20
	Cefalexin	100	700	20/20
Cefalonium	20	5	20/20	
Tetracyclines	Tetracycline	100	100	58/60
	Oxytetracycline	100	100	60/60
	Chlortetracycline	100	35	20/20
	Doxycycline*	---	14	59/60

MRL: Maximum residue limit (EU regulation 37/2010 (status on September 1, 2010))

\* not allowed to be given to lactating cows

more ►

Anexo 6. Ordeño de caprinos a orillas de las calles en el sur de la ciudad de Quito: Sector Moraspungo.



Anexo 7. Ordeño de caprinos a orillas de las calles en el sur de la ciudad de Quito: Mercado Mayorista.





Anexo 8. Expendio de la leche recién ordeñada en bolsas plásticas.



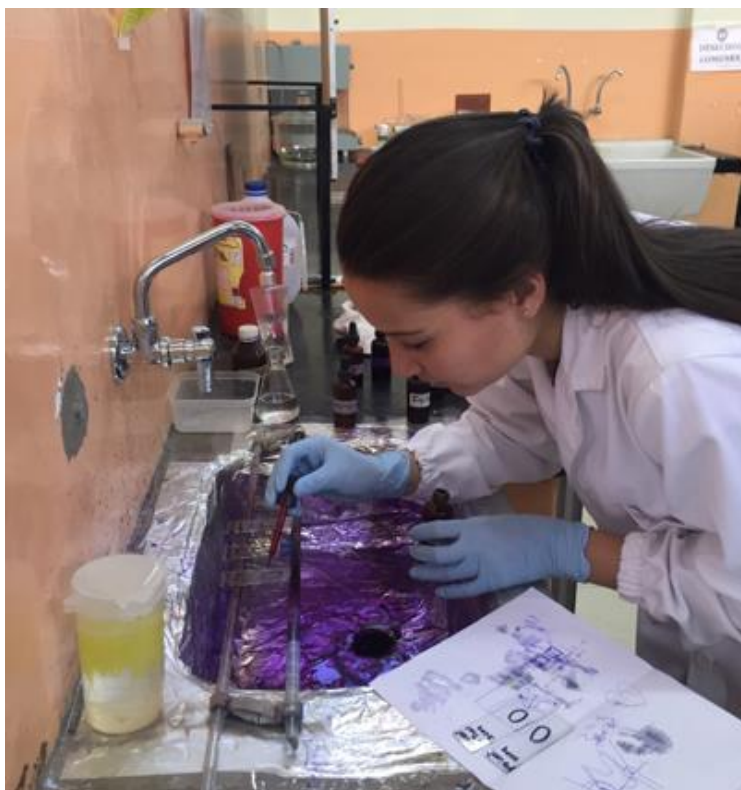
Anexo 9. Expendio del producto en vasos plásticos.



Anexo 10. Cabras que utilizan para expender leche cruda recién ordeñada a orillas de las calles en el sur de la ciudad de Quito.



Anexo 11. Trabajo en el laboratorio: tinción Gram de muestras macroscópicamente positivas.



Anexo 12. Trabajo en el laboratorio: homogeneización de las muestras en el Vortex GENIE a 500 rpm.



Anexo 13. Trabajo en el laboratorio: siembra de las muestras en el medio de cultivo Mac Conkey con el asa Digiralsky.



Anexo 14. Desarrollo de las fórmulas correspondientes para el cálculo del intervalo de 95% de confianza para el totalidad de las muestras en las que se identificaron coliformes.

#### PRIMER PASO: CÁLCULO DE LA MEDIA MUESTREAL

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{11}{94} = 0,11$$

#### SEGUNDO PASO: CÁLCULO DEL ERROR ESTÁNDAR

$$Sem = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

$$Sem = \sqrt{\frac{0,11(1-0,11)}{94}} = 0,032$$

#### TERCER PASO: CÁLCULO DEL INTERVALO CON UN 95% DE CONFIANZA

$$IC = \bar{X} - 1,96 \times Sem \leq \mu \leq \bar{X} + 1,96 \times Sem$$

$$IC = 0,11 - 1,96 \times 0,032 \leq \mu \leq 0,11 + 1,96 \times 0,032$$

$$IC = 0,047 \leq \mu \leq 0,17$$

#### LEYENDA

*IC: intervalo de confianza*

*$\bar{X}$ : media muestral*

*Sem: error estándar*

*$\mu$  = media aritmética del universo*

*$\sum X_i$  = sumatoria de muestras*

*n = tamaño de la muestra*

*p = prevalencia*

Anexo 15. Desarrollo de las fórmulas correspondientes para el cálculo del intervalo de 95% de confianza para las muestras en las que se identificó *Pantoea* spp. (4,3%).

#### PRIMER PASO: CÁLCULO DE LA MEDIA MUESTREAL

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{4}{94} = 0,042$$

#### SEGUNDO PASO: CÁLCULO DEL ERROR ESTÁNDAR

$$Sem = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

$$Sem = \sqrt{\frac{0,042(1-0,042)}{94}} = 0,020$$

#### TERCER PASO: CÁLCULO DEL INTERVALO CON UN 95% DE CONFIANZA

$$IC = \bar{X} - 1,96 \times Sem \leq \mu \leq \bar{X} + 1,96 \times Sem$$

$$IC = 0,042 - 1,96 \times 0,020 \leq \mu \leq 0,042 + 1,96 \times 0,020$$

$$IC = 0,0028 \leq \mu \leq 0,0812$$

#### LEYENDA

*IC*: intervalo de confianza

$\bar{X}$ : media muestral

*Sem*: error estándar

$\mu$  = media aritmética del universo

$\sum X_i$  = sumatoria de muestras

*n* = tamaño de la muestra

*p* = prevalencia

Anexo 16. Desarrollo de las fórmulas correspondientes para el cálculo del intervalo de 95% de confianza para las muestras en las que se identificó *Escherichia vulneris* (2,1%).

#### PRIMER PASO: CÁLCULO DE LA MEDIA MUESTREAL

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{2}{94} = 0,02$$

#### SEGUNDO PASO: CÁLCULO DEL ERROR ESTÁNDAR

$$Sem = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

$$Sem = \sqrt{\frac{0,02(1-0,02)}{94}} = 0,014$$

#### TERCER PASO: CÁLCULO DEL INTERVALO CON UN 95% DE CONFIANZA

$$IC = \bar{X} - 1,96 \times Sem \leq \mu \leq \bar{X} + 1,96 \times Sem$$

$$IC = 0,02 - 1,96 \times 0,014 \leq \mu \leq 0,02 + 1,96 \times 0,014$$

$$IC = -0,007 \leq \mu \leq 0,047$$

#### LEYENDA

*IC*: intervalo de confianza

$\bar{X}$ : media muestral

*Sem*: error estándar

$\mu$  = media aritmética del universo

$\sum X_i$  = sumatoria de muestras

*n* = tamaño de la muestra

*p* = prevalencia

Anexo 17. Desarrollo de las fórmulas correspondientes para el cálculo del intervalo de 95% de confianza para las muestras en las que se identificó *Providencia rettgeri* (1,1%), *Rahnella aquatilis* (1,1%), *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* (1,1%), *Buttiauxella agrestis* (1,1%) y *Enterobacter amnigenus* (1,1%).

#### PRIMER PASO: CÁLCULO DE LA MEDIA MUESTREAL

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{1}{94} = 0,010$$

#### SEGUNDO PASO: CÁLCULO DEL ERROR ESTÁNDAR

$$Sem = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

$$Sem = \sqrt{\frac{0,010(1-0,010)}{94}} = 0,01$$

#### TERCER PASO: CÁLCULO DEL INTERVALO CON UN 95% DE CONFIANZA

$$IC = \bar{X} - 1,96 \times Sem \leq \mu \leq \bar{X} + 1,96 \times Sem$$

$$IC = 0,010 - 1,96 \times 0,01 \leq \mu \leq 0,010 + 1,96 \times 0,01$$

$$IC = -0,009 \leq \mu \leq 0,029$$

#### LEYENDA

*IC*: intervalo de confianza

$\bar{X}$ : media muestral

*Sem*: error estándar

$\mu$  = media aritmética del universo

$\sum X_i$  = sumatoria de muestras

*n* = tamaño de la muestra

*p* = prevalencia