

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN
MUESTRAS DE LECHE CRUDA PROCEDENTE DE DIFERENTES PREDIOS
DEL DEPARTAMENTO DE RISARALDA**

(Autor)

Daniela Maria Galeano Prada

UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL PEREIRA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE MICROBIOLOGA

Pereira, Risaralda

2017

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN
MUESTRAS DE LECHE CRUDA PROCEDENTE DE DIFERENTES PREDIOS
DEL DEPARTAMENTO DE RISARALDA**

Daniela Maria Galeano Prada

**Trabajo de grado como requisito para optar por el título de
Microbiólogo**

**Director: MSc. Elizabeth Castaño Moreno
Docente investigador Facultad ciencias de la salud**

**UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL PEREIRA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA
Pereira, Risaralda
2017**

Tabla de contenido

1	Resumen ejecutivo	6
2	PROBLEMA DE INVESTIGACION	9
2.1.1	Antecedentes del problema	9
2.1.2	Planteamiento del problema	12
3	JUSTIFICACIÓN.....	13
4	OBJETIVOS	15
4.1.1	OBJETIVO GENERAL.....	15
4.1.2	OBJECTIVOS ESPECÍFICOS.....	15
5	MARCO teórico.....	16
5.1.1	La leche.....	16
5.1.2	Calidad de la leche	16
5.1.3	Características de la leche cruda.....	16
5.1.4	Marco Normativo	19
6	MATERIALES Y METODOS	21
6.1.1	POBLACIÓN Y MUESTRA	21
6.1.2	TOMA DE MUESTRA	21
6.1.3	Procedimientos de siembra y aislamiento selectivo.	22
6.1.4	Tinción de Gram	23
6.1.5	Staphylococcus aureus coagulasa positiva	25
7	Resultados.....	26
7.1.1	Prueba de tinción de Gram	26

7.1.2	Staphylococcus aureus coagulasa positiva	27
8	DISCUSIÓN.....	28
9	CONCLUSIONES.....	31
10	BIBLIOGRAFIA	33
11	ANEXOS.....	38

LISTADO DE ILUSTRACIONES.

Ilustración 1	21
Ilustración 2	22
Ilustración 3	23
Ilustración 4	23
Ilustración 5	24
Ilustración 6	25
Ilustración 7	26
Ilustración 8	28
Ilustración 9	39
Ilustración 10	39
Ilustración 11	40

1 RESUMEN EJECUTIVO

El mercado de la leche cruda en Colombia es objeto de regulación por parte de las entidades sanitarias del país, ya que este producto es uno de los de mayor impacto en salud pública por ser un alimento de alto riesgo¹. Ello debido a que su calidad e inocuidad, se ve comprometida desde la producción primaria hasta que llega al consumidor final, por peligros biológicos, químicos y físicos. La inadecuada manipulación de la leche cruda, las malas prácticas de ordeño en la producción primaria, la baja capacidad de frío, ya que hay una capacidad instalada pero es insuficiente, y la ausencia en algunas áreas que se pueden considerar como cuencas o microcuencas productoras para el enfriamiento de la leche cruda, conllevan al crecimiento microbiano en menor tiempo, poniendo en riesgo a la población que la consume, además de las condiciones ambientales que inciden directamente en la calidad del producto. Así, dentro de los peligros más relevantes que afectan la leche, se mencionan los microorganismos patógenos, la presencia de toxinas, las sustancias químicas tales como residuos de plaguicidas usados en la producción agrícola de forrajes y en control de plagas que afectan los cultivos, residuos de medicamentos veterinarios usados para el manejo sanitario de los bovinos, metales pesados, los cuales pueden causar alteración microbiológica y físico-química en este producto². La presencia de compuestos o sustancias químicas son potencialmente dañinos para los consumidores por lo cual organizaciones tales como FAO y OMS, han indicado la importancia de realizar estudios de evaluación de riesgos en peligros químicos en alimentos.

¹ CONPES. (Consejo Nacional de Política Económica y Social), MADR, MPS, MAVDT, MCIT, DNP. 3376: Política sanitaria y de inocuidad para las cadenas de carne bovina y de la leche. República de Colombia, Departamento Nacional de Planeación. 2005

² FAO. Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas. Roma. 2003:2- 15

Ciertas bacterias pueden llegar a afectar gravemente la calidad de la leche cruda, entre ellas se encuentra el *S. aureus*, el *Staphylococcus aureus*, es una bacteria Gram positiva, anaerobias facultativa de forma redonda que se dividen en varios planos para formar agrupaciones irregulares. Los microorganismos indicadores de calidad en leche son utilizados principalmente para determinar el crecimiento de patógenos que puedan afectar la calidad de los productos lácteos, *Staphylococcus aureus* es utilizado como microorganismo indicador de calidad en leche.

La presencia de esta bacteria en la leche cruda, indica un inadecuado proceso al momento del ordeño, y una baja calidad higiénica y sanitaria, ya que sus características de composición favorecen la proliferación microbiana y por consiguiente cualquier deficiencia en sus condiciones de producción, procesamiento, manipulación, conservación, transporte y comercialización pueden ocasionar trastornos en la salud de los consumidores. La calidad higiénica de la leche tiene una importancia fundamental para la producción de una leche y productos lácteos que sean inocuos e idóneos para los usos previstos. Para lograr esta calidad, se han de aplicar buenas prácticas de higiene a lo largo de toda la cadena láctea. Los productores de leche a pequeña escala encuentran dificultades para producir productos higiénicos por causas como la comercialización, manipulación y procesamiento informal y no reglamentada de los productos lácteos; la falta de incentivos financieros para introducir mejoras en la calidad, y el nivel insuficiente de conocimientos y competencias en materia de prácticas de higiene.

Esta bacteria puede llegar a desencadenar varios problemas de salud en la vaca, entre ella es la mastitis bovina, esta enfermedad es una inflamación de la glándula mamaria, que provoca cambios en la composición bioquímica de la leche y en el tejido de la glándula. Moreno nos dice que: La causa principal de mastitis bovina es el *S. aureus*, la infección tiene lugar a través del canal del pezón y su curso varía desde subclínico a agudo supurativo, gangrenoso o crónico, dependiendo de la cepa infectante, dosis infectante y resistencia del hospedador. Esta infección microbiana es la causa más importante de pérdidas en la industria de los lácteos, y

se deben principalmente a la baja producción, baja calidad y altos costes de producción.

El propósito de la investigación, fue evaluar la contaminación por la bacteria *Staphylococcus aureus* en muestras de leche cruda tomadas en predios del departamento de Risaralda, para así diagnosticar su calidad higiénico sanitaria. Para llevar a cabo el análisis, a dichas muestras se les realizó diluciones seriadas y se ejecutó una siembra por profundidad en agar Baird Parker, las cuales se dejaron por 48 horas en incubación y 18 horas más para confirmar la presencia de esta bacteria; una vez finalizado el periodo de incubación, se les realizó la prueba de tinción de gram, la cual permitiría identificar la morfología característica de *S. aureus*, seguidamente se realizó la prueba bioquímica de la coagulasa, a la cual a 0,5 mL de plasma de conejo se le inoculo directamente varias colonias sospechosas y se procedió a llevarlas a la incubadora por 4 horas para ver su reacción final y comprobar contaminación por la bacteria *S. aureus*.

Palabras Clave: Leche cruda, *Staphylococcus aureus*, Calidad Microbiológica, inocuidad, salubridad, proliferación microbiana, desinfección, manipulación, producción tincion de Gram, coagulasa positiva.

2 PROBLEMA DE INVESTIGACION

2.1.1 Antecedentes del problema

“Las nuevas tendencias mundiales en la producción agropecuaria, hacen énfasis en la obtención de productos de alta calidad e inocuos para el consumo humano, siendo la búsqueda de estas características una preocupación constante de todos los constituyentes de la cadena láctea y es a nivel de la finca en donde se deben garantizar las condiciones para la obtención de un producto de óptima calidad”³

La leche es el único material producido por la naturaleza para funcionar exclusivamente como fuente de alimento. Por esto, un factor fundamental que influye sobre el valor de aceptación universal de la leche es la imagen que ésta representa, a saber, que constituye una fuente nutritiva, no superada por ningún otro alimento conocido por el ser humano. La confirmación de esta imagen nutritiva está en el uso extensivo que tienen la leche y sus derivados, como parte de la dieta diaria de los pueblos de los países altamente desarrollados ⁴

A consecuencia de esto, al no llevarse una adecuada manipulación de la leche, esta puede verse afectada por diferentes microorganismos, en los cuales se encuentra la bacteria *Staphylococcus aureus*.

Hay múltiples factores que influyen en la contaminación, ya sea en forma aislada o en conjunto, las cuales van en detrimento de la calidad higiénica y nutricional del producto y, consecuentemente, afectar el correcto funcionamiento de la salud pública y economía de cualquier país. Uno de estos agentes es la bacteria en cuestión la cual produce grandes riesgos como lo son: la proliferación de sí misma, alteración físico-química de los componentes del producto, obtención de olores extraños, generación de malos sabores y como consecuencia de su intento de

³ Calderón, A., García, F. y Martínez, G. (2006). Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. Rev. MVZ Córdoba. 11:725- 737.

⁴ Magariñes. H. (2000). Producción higiénica de la leche cruda. Producción y servicios incorporados. Valdivia, Chile.

erradicación, la contaminación con sustancias químicas tales como pesticidas, antibióticos, detergentes, desinfectantes, y demás elementos productores de partículas de suciedad, etc.

Es por todo lo anterior que el desafío para quienes trabajan en el sector lechero no sólo es producir mayor cantidad de leche sino, también, de alta calidad higiénica, y para ello deben contemplarse aspectos fundamentales, como lo son la higiene microbiológica, higiene química e higiene estética. Tres aspectos que, unidos, pueden contribuir favorablemente a la mejora del sector lechero de nuestros países, con el beneficio consecuente en el desarrollo físico e intelectual de las generaciones venideras. “En Colombia, según la información registrada en el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) durante el año 2009 se presentaron 899 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, de los cuales solo en el 56% se identificó agente el patógeno (SIVIGILA. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública.)”⁵

En el 2011, también se evidenció el *Staphylococcus Aureus*, en la producción de leche en departamentos como Córdoba, Boyacá, Cundinamarca y Sucre.

En Córdoba, de 329 muestras analizadas, se observó una prevalencia del 87,84% donde el principal agente etiológico aislado de la leche cruda de bovinos con mastitis clínica y subclínica, fue la bacteria de *Staphylococcus Aureus* en sistemas doble propósito.

En Boyacá y Cundinamarca, de 1.143 muestras analizadas, prevaleció el 29,09% de la leche cruda infectada con la bacteria *Staphylococcus Aureus*, por cuartos infectados con mastitis clínica y subclínica en fincas especializadas del altiplano cundiboyacense.

Se particularizó en las regiones de Chicamocha y Paipa en Boyacá. En Chicamocha, se realizaron 2 muestreos; en el primero se analizaron 34 muestras

⁵ Sivigila. (2007) *Sistema Nacional De Vigilancia En Salud Pública*. Enfermedades Transmitidas Por Alimentos.

de leche cruda provenientes de 34 hatos, donde el 41% se encontró superando las 100.000 UFC/ml.

En el segundo muestreo se realizó en épocas de lluvias y aplicando terapia de la vaca seca, analizándose 33 muestras en leche cruda y solo el 9,09% superó las 100.000 UFC/ml, mostrando este estudio que el recuento fue mayor en época de lluvias, debido a la contaminación de las ubres de las vacas con barro y estiércol y a la alta humedad, lo que facilitó mayor proliferación de los microorganismos.

En Paipa por su parte, se reportaron niveles de contaminación similares en la leche cruda de los proveedores y en las mezclas; de 20 muestras que se analizaron, la prevalencia fue del 100%, los recuentos variaron de $1,3 \times 10^2$ a $1,9 \times 10^5$ UFC/ml, la última concentración fue suficiente para producir la toxina.

En Sucre, de 179 muestras analizadas se encontró una prevalencia del 94% en muestras de leche cruda en centros de acopio recolectadas en verano con recuentos superiores a 10^3 UFC/ml; y de un 100% de prevalencia en invierno, con recuentos superiores a 10^3 UFC/ml.

En lo que compete a Risaralda en cuanto a la calidad higiénica de la leche los valores que proporciona el estudio, son los siguientes: de 43 muestras sometidas a control 19 de ellas (que corresponden al 44%) fueron aceptadas, 17 (que corresponden al 40%) fueron rechazadas, 5 (que corresponden al 12%) no se les hizo prueba y de 2 (que corresponden al 5%) no se registró dato. (Mercado, et al. 2014).de la normatividad propuesta para el control de calidad e inocuidad del producto. Lo que, llegado el caso representaría una pérdida del material producido y por ende para la industria, una pérdida de recursos primarios y económicos que afectarían directamente al productor.

El gran desafío es para quienes trabajan en el sector lechero ya que no sólo se trata de producir mayor cantidad de leche, sino también, de alta calidad higiénica, y para ello deben contemplarse aspectos fundamentales, como lo son la higiene microbiológica, higiene química e higiene estética. Tres aspectos que, unidos, pueden contribuir favorablemente a la mejora del sector lechero de nuestro país,

con el beneficio consecuente en el desarrollo físico e intelectual de las generaciones venideras..

La presencia de esta bacteria en la leche, es debido a que no se están siguiendo los requerimientos correctos de las Buenas Prácticas pecuarias, por esto es muy importante que al momento de manejar un alimento, en este caso la leche cruda, es de importancia que se lleven a cabo todos los parámetros establecidos por las normas.

2.1.2 Planteamiento del problema

El sector lechero en Colombia se ve muy afectado debido a que, en la gran mayoría, no se presentan buenas prácticas de ordeño y se lleva a cabo una mala higiene de todos los procesos ejecutados, ya que estos no cumplen con las debidas normas y reglas que se deben seguir para que la leche producida sea de alta calidad. Esto es debido a que la gran mayoría de los predios destinados para esta actividad no cuenta con un espacio idóneo y de fácil limpieza y desinfección al momento de extraer la leche y que garantice que se obtendrá un producto inocuo, debido al gran costo que representa la inversión en una sala de ordeño convencional.

La higiene y una excelente cadena de trazabilidad, son los principales fundamentos de todos los procesos y fases de la tecnología e inspección de los alimentos, con destino al consumo humano. La preparación de las vacas para el ordeño es la consecución del ordeño higiénico de pezones. La higiene externa del equipo de ordeño y el confort de las vacas en las instalaciones, también determinan la calidad del proceso. Como lo menciona Castro Ramírez: La higiene interna del equipo determina junto con la cadena del frío, la calidad microbiológica de la leche⁶.

⁶ Ramírez, A. (2002). Ganadería Leche enfoque empresarial. Revista *Producción bovina*. Tomo 1

3 JUSTIFICACIÓN

En Colombia, existen diversas fuentes de alimentación pecuaria, la leche es uno de los alimentos más importantes a nivel económico en países ganaderos, gracias a la gran cantidad de nutrientes que poseen los productos lácteos, estos se convierten en la principal fuente de almacenamiento de microorganismos. La leche cruda es leche que no ha sido pasteurizada para eliminar los gérmenes peligrosos. Los gérmenes incluyen bacterias, virus y parásitos. Es importante comprender los riesgos de beber leche cruda. Si bien es cierto que muchos alimentos pueden provocar intoxicación alimentaria o enfermedades, la leche cruda es la que conlleva mayor riesgo. Uno de los grandes problemas que presenta el sector lácteo en Colombia es que las prácticas que realizan los ordeñadores no son vigiladas y al no cumplir con los estándares de calidad apropiados, los productos lácteos obtienen gran cantidad de microorganismos patógenos que pueden alterar las capacidades organolépticas del producto, así como la salud de los consumidores.

“la leche es un producto natural cuyo origen en la glándula mamaria es normalmente estéril o con muy baja carga bacteriana, pero en la práctica es difícil mantener esas condiciones y la contaminación siempre va a estar presente al ser obtenida de la ubre de la vaca”⁷.

La calidad de la leche cruda puede verse deteriorada, debido a un manejo inadecuado de los utensilios de ordeño, transporte o adulteración, aumentando la carga bacteriana y propiciando propiedades indeseables de acidez, rancidez o agriado. Provocando así de que sea atacada por diferentes microorganismos entre ellos el *Staphylococcus aureus*.

⁷ Espinosa, Y. Rodríguez, Y. (2008) Estudio bacteriológico de leche cruda por el sistema Diralec en un municipio de la región oriental del país. Revista (*Redvet*). Volumen IX número 7.

De lo anterior se justifica que es de suma importancia que los pequeños productores y comercializadores de leche cruda del país, cumplan con todas las normas establecidas y de esta manera se puedan implementar buenas prácticas agropecuarias para extraer un producto inocuo el cual no afecte contra salud del consumidor final. Existe además el compromiso del Estado por asegurar que la totalidad de la leche fresca que se produce en Colombia sea acopiada, procesada y comercializada por industrias formalmente constituidas (Decreto 616 de 2006 y Decreto 1880 de 2011), a través de la expansión de la capacidad transformadora del país mediante la puesta en funcionamiento de nuevas plantas de procesamiento de leche.

Por tal razón, se llevaron a cabo estudios en los cuales nos ayudaron a identificar la calidad higiénico sanitaria de las muestras de leche cruda recolectada en los diferentes predios de los municipios del departamento de Risaralda, los cuales nos arrojaron resultados de presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, lo que indica que en estos predios de producción de leche cruda no están cumpliendo con las debidas normas estandarizadas para garantizar que su leche es apta para el consumo humano, lo cual podría llegar a desencadenar una enfermedad transmitida por el consumo de este alimento.

4 OBJETIVOS

4.1.1 OBJETIVO GERERAL

Realizar aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche cruda procedentes de diferentes predios del departamentos de Risaralda

4.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la calidad higiénico sanitaria para determinar si en las muestras de leche cruda se encontraba la presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus*
- Detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche
- Llevar a cabo una identificación morfológica de la bacteria *S. aureus* por medio de la tinción de Gram
- Realizar la prueba de coagulasa positiva en tubo, como diagnostico final para confirmar la presencia de la bacteria *S. aureus* en las muestras de leche cruda

5 MARCO TEÓRICO

5.1.1 La leche

“La leche es un compuesto líquido, opaco, de color blanco marfil y de sabor dulce, que se obtiene del ordeño higiénico, proveniente de un animal en buen estado de salud y alimentación. Es un producto apto para el consumo humano por su alta calidad nutritiva, siempre y cuando se encuentre libre de sustancias tóxicas, microorganismos y calostros que alteran su composición”⁸

5.1.2 Calidad de la leche

La leche que sale de los hatos debe conservar su calidad para garantizar la confianza en el consumidor; sin embargo, se puede ver alterada durante su transporte y comercialización. La leche por su alto valor nutritivo puede verse comprometida en su calidad, diversos factores contribuyen a su deterioro dentro de los que se incluyen: adición de agua, residuos de detergentes, desinfectantes, antibióticos, pesticidas, etc.

5.1.3 Características de la leche cruda

La leche cruda está compuesta principalmente por agua, proteína, grasa, lactosa, vitaminas y minerales. Estos componentes son los que determinan la calidad de la leche cruda y pueden variar según la raza del animal, las condiciones ambientales y el tipo de alimentación que se le ofrezca al animal. La proporción de agua en la leche cruda varía entre el 85,3 y 88,7% (p/p), con proteína equivale entre 2,3 y 4,4 % (p/p) y la lactosa entre 3,8 y 5,3%. La grasa fluctúa entre 2,5 a 5,5% (p/p), y es considerada la variable más importante para la industrialización de la leche; un

⁸ Vargas, T.(2006). Calidad de la leche. Monografía. Fundación INLACA. Facultad de ciencias veterinarias UCV

porcentaje más alto de grasa, indica que leche cruda es de alta calidad, además es una variable que incrementa el valor económico de la leche cruda.

4.4 Análisis microbiológico de la leche

Para que la leche cumpla con los estándares de calidad indicados para el consumo humano es necesario que la calidad de la leche provenga del ordeño de vacas sanas bien alimentadas, con cantidad y calidad apropiada de componentes sólidos como la grasa, la proteína, la lactosa, las vitaminas y los minerales libre de olores, sedimentos, sustancias extrañas, residuos químicos e inhibidores, libre de bacterias causantes de enfermedad, y con un mínimo de carga microbiana y células somáticas⁹.

La inocuidad de la leche cruda, se mide según el número de bacterias por mililitro de leche en ausencia de inhibidores microbianos y el conteo de células somáticas con respecto a la contaminación de la leche por bacterias, esta inicia con una flora que se encuentra adherida a la pared del canal del pezón y concluye con los microorganismos presentes en el ambiente que entran en contacto con la leche después de ser extraída de la ubre; estos inhiben su crecimiento a los 4°C. “Por último, el contenido de células somáticas en la leche, se relaciona con la inflamación de la glándula mamaria, producto de un golpe, desarrollo de patógenos o a un mal manejo del ordeño, instalaciones inadecuadas y al proceso en general del ordeño”¹⁰

4.5 Importancia de la leche cruda en salud pública

El instituto nacional de salud dice que: “Los códigos de alimentos a nivel mundial, insisten que la leche y sus derivados deben estar libres de residuos de inhibidores, principalmente de antibióticos. “Así mismo en la parte de peligros biológicos, la

⁹ Becerra, RJ. (2011). Revista. Rev. Científica, Venez.11 (2):156–61.

¹⁰ Camussone CM, Calvino LF. (2013). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. Rev (*Argent Microbiol.*) 45(2):119–30

importancia radica en la posibilidad de causar enfermedades de tipo zoonótico como Brucelosis y Tuberculosis, así como enfermedades de origen alimentario como Salmonelosis, Listeriosis, colitis hemorrágica, e intoxicaciones por el consumo de toxinas preformadas de *Staphylococcus aureus*" ¹¹

La leche recién ordeñada debe ser enfriada lo más rápidamente a 4°C, y conservada a esta temperatura hasta su tratamiento térmico, previo proceso, ya que la inadecuada conservación de la leche cruda, crea las condiciones favorables para la proliferación bacteriana y la consecuente producción de toxinas.

4.6 Presencia de *Staphylococcus aureus* en la leche Cruda

El *Staphylococcus aureus* se encuentra en leche cruda en bajas cantidades, incluso con la presencia de buenas prácticas de manufactura. El peligro de la toxina en lácteos es muy común en vacas con mastitis, cuya infección es causada por bacterias como el *Staphylococcus*. También el *S. aureus* puede ser introducido en cualquier punto después de la recolección de la leche por prácticas higiénicas inadecuadas del personal como un mal lavado de manos, equipos y utensilios que no están bien limpios y desinfectados o contaminados con leche cruda e incluso se puede generar la toxina por la proliferación recuentos altos de *S. aureus*. Según FDA: "Los niveles de *S. aureus* mayores a UFC/g representan un riesgo para la salud, otros mencionan como límite recuentos de UFC/g en adelante ya hay suficiente toxina para producir los síntomas de la intoxicación"¹²

¹¹ INS. 2011. Identificación de riesgos biológicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos UERIA Instituto Nacional de Salud INS. Primera edición. Imprenta Nacional de Colombia. Pág. 1-111.

¹² FOOD DOCTORS. 2008. The Food Safety File: *Staphylococcus aureus*. Extraído: 7/11/2012

4.7 Descripción del microorganismo de estudio

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas.

El nombre de *Staphylococcus*, del griego staphyle que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos. tiene un metabolismo de tipo fermentativo y anaerobio facultativo, catalasa positiva y oxidasa negativa. Son capaces de fermentar la glucosa sin producción de gases y producen acetil metil carbinol. Fermentan también el manitol con formación de ácidos y puede hacerlo en anaerobiosis. No hidrolizan el almidón y son capaces de crecer en presencia de un 40% de bilis. Poseen una enzima, la coagulasa, que la diferencia del resto de las especies del género; ésta tiene la facultad de reaccionar con el fibrinógeno dando lugar a un coágulo de fibrina. También presentan la proteína A, una proteína de unión inespecífica a anticuerpos que está relacionada con su virulencia

5.1.4 Marco Normativo

La normatividad es necesaria para que los ganaderos avancen de manera coordinada o estandarizada en las buenas prácticas ganaderas en aras, de mejorar sin interrupciones, la productividad y ponerla a los niveles de los países líderes en ganadería bovina del mundo. Este espacio contiene las normas que atañen a la institucionalidad, a la actividad cárnica y de su sacrificio, a la producción de leche,

al bienestar animal y a la movilización y comercialización de animales y, también, las que fomentan la actividad ganadera.

En Colombia la calidad y vigilancia en el ámbito normativo para el control de la leche cruda se basan principalmente en:

DECRETO 616 DE 2006. Ministerio De La Protección Social. Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendia, importe o exporte en el país.

DECRETO 1880 DE 2011. Por el cual se señalan los requisitos para la comercialización de leche cruda para consumo humano directo en el territorio nacional.

NTC 666 de 1997. Leche y productos lácteos. Toma de muestra.

DECRETO NÚMERO 1673 DE 2010. Garantizar la protección de la salud de los consumidores, la leche por su naturaleza, debe cumplir con los requisitos señalados en los Decretos 3075 de 1997 y 616 de 2006.

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 399. Esta norma establece los requisitos que debe cumplir la leche cruda como materia prima para su industrialización.

Las nuevas tendencias mundiales en la producción agropecuaria, hacen énfasis en la obtención de productos de alta calidad e inocuos para el consumo humano, siendo la búsqueda de estas características una preocupación constante de todos los constituyentes de la cadena láctea y es a nivel de la finca en donde se deben garantizar las condiciones para la obtención de un producto de óptima calidad

6 MATERIALES Y METODOS

6.1.1 POBLACIÓN Y MUESTRA

Se tomaron muestras de predios productores de leche cruda en el departamento de Risaralda. Las muestras fueron compuestas por leche cruda tomadas directamente del ordeño diario en los predios.

6.1.2 TOMA DE MUESTRA

Las muestras se tomaron en botellas plásticas estériles con capacidad de 1 litro, fueron transportadas en nevera de icopor con pilas refrigerantes para retardar el crecimiento de los microorganismos.

Se llevaron al laboratorio de investigación del programa de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la universidad libre seccional Pereira, donde fueron analizadas para identificar la flora predominante y la presencia de *S. aureus*.



Ilustración 1

Imagen 1. Muestra de leche cruda en los diferentes predios del departamento de Risaralda (Fuente Propia)

6.1.3 Procedimientos de siembra y aislamiento selectivo.

Para el análisis microbiológico, de las muestras, se tomaron 10 mL de leche cruda y se homogeneizaron con 90 mL de Agua Peptonada (AP) al 0.1 % en Stomacher, lo que constituyó la dilución 10^{-1} a partir de esta se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-4} (1.0 ml de muestra + 9.0 ml de agua peptona 0.1 %), se sembraron 0.1 ml en Agar Baird Parker por duplicado y se incubó por 48 horas a 36°C , se realizó el conteo y la selección de las colonias correspondientes al microorganismo.



Ilustración 2

Imagen 2. Proceso de homogenización de las muestras de leche en el Stomacher y dilución con agua peptona (Fuente propia)

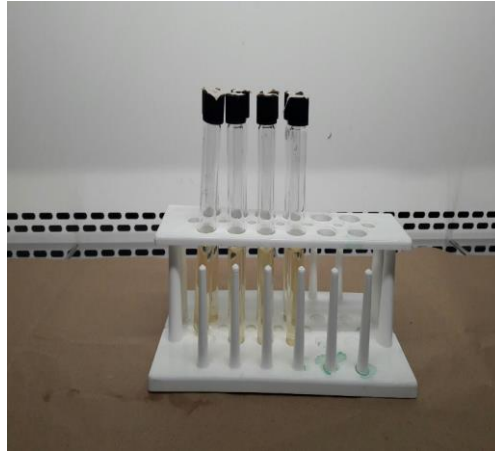


Ilustración 3

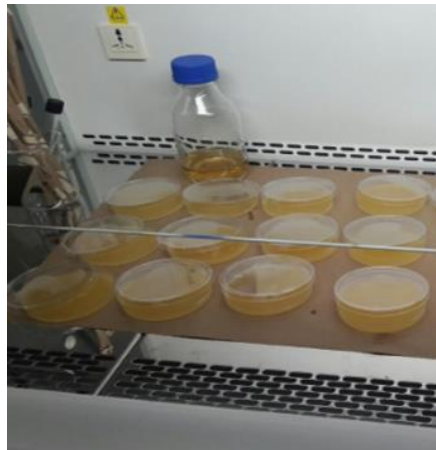


Ilustración 4

Imagen 3 y 4. Diluciones seriadas y proceso de siembra de la leche cruda en agar Baird Parker (Fuente Propia).

6.1.4 Tinción de Gram

Para llevar a cabo el procedimiento de tinción de gram, se seleccionaron 5 portaobjetos completamente limpios, en cada uno de ellos se depositó una pequeña gota de agua destilada y sobre esta se puso una colonia del microorganismo; con ayuda de un asa se hizo un pequeño frotis y se fijó el material al portaobjeto pasándolo 3 veces por la llama del mechero.

Seguidamente todos los portaobjetos se dejaron encima de un soporte y se cubrieron de cristal violeta por 2 minutos, pasado este tiempo se lavaron con agua

destilada para así eliminar restos de este. Una vez terminado este proceso se dio paso a agregarles Lugol por 2 minutos y retirarlo con agua, después de retirar el Lugol se le aplicaron a cada una de las muestras alcohol por 30 segundos y se lavaron cada uno de los portaobjetos con agua, para sí finalizar cubriendo cada una de las superficies de estas con Safranina por 2 minutos y pasado este tiempo se lavaron de nuevo con agua destilada.

Una vez que se terminó con el proceso de tinción, los portaobjetos se dejaron secar al aire libre para posteriormente ser evaluadas al microscopio.



Ilustración 5

Imagen 5. Procedimiento de tinción de gram (Fuente Propia)

6.1.5 *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

Para llevar a cabo esta prueba se utilizó varios tubos eppendorf cada uno con 0.5 mL de plasma de conejo, al cual se les inocularon directamente colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus*, y seguidamente, se procedió a llevar las muestras a la incubadora por 4 horas para observar sus resultados.



Ilustración 6

Imagen 6. Inoculación del microorganismo sospechoso directamente en el plasma de conejo
(Fuente Propia)

7 RESULTADOS

7.1.1 Prueba de tinción de Gram

Los resultados arrojados en la tinción de Gram, nos muestran cocos que se agrupan en pares o racimos y cuyas células individuales muestran variaciones de tamaño.

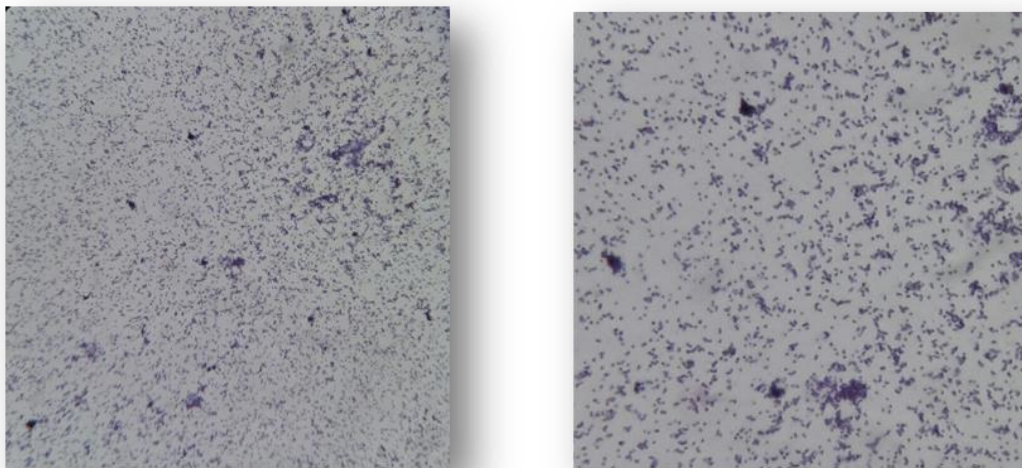


Ilustración 7

Imagen 7. *Staphylococcus aureus*, cocos Gram positivos vistos al microscopio por el objetivo de 40x (Fuente Propia)

Por medio de la prueba de tinción de gram, se confirmó la contaminación de las muestras por *Staphylococcus aureus*, la cual, es una bacteria Gram positiva, que posee una gruesa capa de peptidoglucanos, además de poseer ácidos teicoicos. Las presencias de los dos factores antes mencionados representan un riesgo aumentado en la muestra, debido a que “ambos van directamente a adherirse a la pared celular, generando un aumento en su rigidez y evitando el proceso osmótico lo cual favorece que la bacteria cumpla sus funciones y actúe en las condiciones

óptimas”.¹³ Además, las características de los ácidos teicoicos y su posicionamiento, promueven la adhesión bacteriana, por parte de otros microorganismos a la pared celular y a la membrana citoplasmática, dependiendo la disposición de los ácidos teicoicos. Por ende, éstos van a promover la proliferación y fijación bacteriana a la pared celular.

Éste hallazgo en los resultados de la investigación, representa un factor de riesgo y un elemento adicional a tener en cuenta en el análisis de los resultados.

7.1.2 Staphylococcus aureus coagulasa positiva

Transcurridas las 4 horas de la inoculación del microorganismo en el plasma de conejo, se procedió a revisar el efecto final que la prueba había tenido sobre la bacteria; esta prueba detecto la estafilocoagulasa extracelular (denominada a veces coagulasa libre) que activa la protrombina y, como consecuencia, inicia la formación de coágulos en el plasma.”¹⁴

En este resultado se logró evidenciar que, en todas las muestras, el plasma de conejo se coagulo, lo cual confirma que dicha bacteria si se encontraba presente en las muestras de leche analizadas

Esta prueba de la coagulasa tiene una grandísima importancia, debido a que esta nos permite diferenciar al *S. aureus* de otras especies del género *Staphylococcus*, si es coagulasa positivo se produce la coagulación del plasma en el cual fue inoculada la colonia sospechosa, de lo contrario quedará éste en estado líquido.

¹³ Bustinza, F (1960) biosíntesis de ácido teicoico y mucopéptido en paredes celulares de *Staphylococcus lactis*

¹⁴ Switalski, L.M. (1976). Isolation and Purification of Staphylococcal Clumping Factor, *Zbl. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg. I. Abt.*, Supplement 5, 413



Ilustración 8

Imagen 8. Prueba confirmatoria de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva en el plasma de conejo (Fuente Propia).

8 DISCUSIÓN

Al analizar los resultados arrojados, se pudo evidenciar que, en las muestras de leche cruda analizadas, poseían una carga microbiana por *S. aureus* alta, lo que indica que en dichos predios no se cumple con altos rangos de higiene en el ordeñador y se carece de la implementación de las buenas prácticas al momento del ordeño. (BPO).

Se considera que las enterotoxinas producidas por el *S. aureus* o estafilocócicas pueden detectarse a partir de la dilución en siembra 10^{-4} UFC/g. Los resultados nos muestran el riesgo que puede representar el consumo de leche cruda con deficientes hábitos de higiene por presencia de microorganismos patógenos; lo que conlleva a la transmisión de enfermedades transmitidas por alimentos, (ETAs). Por ello las buenas prácticas de higiene y de ordeño en la producción primaria de la

leche, el almacenamiento y el transporte son relevantes en la inocuidad, de allí la importancia de conservar altos estándares de calidad de la misma en toda la cadena de producción.

La necesidad de una mayor eficiencia en el proceso industrial de la leche y la creciente demanda del mercado por productos de mayor calidad, traen como consecuencia un incremento en las exigencias de los estándares de la materia prima, lo que afecta económicamente al productor; el principal problema de los pequeños productores, es la descomposición de la leche en el ordeño y transporte por las deficientes condiciones higiénicas y sanitarias, que genera problemas de zoonosis e incrementa el desafío logístico en el control de la calidad de la leche dentro de los mercados¹⁵

En este contexto, es importante precisar que algunos de los problemas que afectan la competitividad del sector lácteo colombiano pueden deberse a la falta de análisis y evaluación microbiológica del producto entre otros factores.

Las muestras de leche cruda fueron consideradas de baja calidad microbiológica, por presentar altos niveles de contaminación por *Staphylococcus Aureus*, ya que al realizar las siembras de las disoluciones 10^{-1} a 10^{-4} se evidencia que las colonias superaron las 300; por lo que no fue posible realizar un conteo del número de colonias totales por dilución ya que el número de conteo de colonias era difícil de determinar, por lo cual esto establece que los problemas encontrados en materia de calidad higiénico sanitaria de leche cruda en los departamentos evaluados, obedecen a la no aplicación por parte de productores y empresas de la normatividad existente para la producción, transporte, acopio y transformación de este producto; es decir existe una falta de cumplimiento del Decretos 616 y el decreto 1880.

¹⁵ FAO. (2006). Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas. Roma.2- 15

Esto nos indica que, en la mayoría de los casos, esta bacteria puede transferirse al alimento por medio de una mala manipulación por parte del ordeñador, esto coincide con la literatura científica internacional donde se considera a los manipuladores como la principal causa de contaminación de los alimentos por este microorganismo

La prueba de coagulasa positiva, nos evidencio resultados positivos por contaminación de la leche y se pudo afirmar que las muestras si estaban contaminadas por nuestro patógeno de estudio.

Gracias a la prueba de tinción de Gram se logró evidenciar la identificación preliminar de la bacteria causal de la contaminación, en la cual se observaban cocos gram positivos los cuales son un grupo heterogéneo de bacterias. Las características que tienen en común son su forma esférica, y su reacción a la tinción de Gram.

Cabe resaltar que, estos resultados arrojados nos brindan un panorama de que algo malo está sucediendo con la calidad microbiológica de la leche de los predios de los municipios evaluados, ya que todas las muestras presentaron crecimiento microbiano por *S. aureus*, lo que indica que no se están llevando bien los protocolos para la recolección de la leche cruda, y la responsabilidad por la contaminación de la bacteria, cae directamente sobre la persona que está realizando la labor del ordeño.

9 CONCLUSIONES

- Se puede mencionar que una baja calidad higiénica en la leche se debe a las condiciones del entorno en las cuales se rodea la vaca igualmente a la hora del ordeño, por consiguiente la contaminación de la leche se debe a que en la gran mayoría no se llevan buenas prácticas de higiene tales como la limpieza y desinfección de área de trabajo, el secado de pezones, y la manipulación de esta, lo cual favorece el aumento de bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, lo cual provoca que haya una baja calidad del producto.
- La prueba de la coagulasa positiva realizada en el laboratorio, ayudo como diagnostico final para la identificación de *S. aureus*.
- La contaminación de la leche en su mayoría es debida a las malas prácticas de higiene lo que aumenta que la calidad se vea afectada y haya una gran proliferación de bacterias *Staphylococcus Aureus* incrementando de esta manera los casos de mastitis y disminuyendo la calidad del producto
- La calidad va más allá de las normas: Se debe hacer control de calidad con el fin de ofrecer productos que satisfagan las exigencias de los consumidores; no se trata solamente de cumplir una serie de normas, especificaciones o estándares de calidad nacionales o internacionales, ya que los consumidores no siempre estarán satisfechos con un producto que cumpla la legislación.

- Las muestras recolectadas presentaron índices de contaminación por la bacteria *s. aureus*, lo cual quiere decir que se están presentando déficits al momento del ordeño debido a la mala manipulación y bajas condiciones de limpieza y desinfección, lo cual conlleva a que el producto se vea afectado y su calidad baje y no sea apta para el consumo humano directo.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Espinosa, Y. Rodríguez, Y. (2008). Estudio bacteriológico de leche cruda por el sistema Diralec en un municipio de la región oriental del país. *Revista Redvet*. 2008. Volumen IX número 7
- Ramírez, A. (2002). *Ganadería Leche enfoque empresarial*. Revista Producción bovina. Tomo 1
- Vargas, T. (2006). *Calidad de la leche*. Monografía. Fundación INLACA. Facultad de ciencias veterinarias UCV
- WingChing Jonez R, Mora Chaves E. (2013). Composición de la leche entera cruda de bovinos antes y después del filtrado. *Agron Mesoamericana, Costa Rica*. 24(1):203–7.
- Becerra Andrade RJ, Pulido Medellín MO, Porras Vargas JL. (2011). Efecto del amamantamiento restringido y la crianza artificial sobre la concentración de grasa en la leche de vacas Holstein cruzadas *Revista. Rev Científica, Venez*. 11(2):156–61.
- Cervantes, E., García, R. y Salazar, M. P. (2014). Características generales del *Staphylococcus Aureus*. *Rev. Lat. De Patología clínica*. 61 (1) 20-40.

Sivigila. Sistema Nacional De Vigilancia En Salud Pública. Enfermedades Transmitidas Por Alimentos. Bogotá. 2007 - 2010.

CONPES. (Consejo Nacional de Política Económica y Social), MADR, MPS, MAVDT, MCIT, DNP. 3376. (2005). Política sanitaria y de inocuidad para las cadenas de carne bovina y de la leche. República de Colombia, Departamento Nacional de Planeación.

Adesiyun A, Webb L, Rahaman S. (1995). Microbiological quality of raw cow's milk at collection centers in Trinidad. *J Food Prot.* 58(2):139-46.

Headrick M, Korangy S, Bean N, Angulo F, Altekruise S, Potter M, Klontz K.(1998). The epidemiology of raw milk associated foodborne disease outbreaks reported in the United States ,1973-1992. *Am J Pub Health.* 88(8):1219-21.

FAO. (2006). Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas. Roma.2-15

Moreno, F.C., Mancera, V.M., Ávila, L.E. y Vargas, M. (2007) Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (departamento de Boyacá). *Rev Med Vet (Bogota)* .14:61–83.

Guillén-López S, Vela-Amieva M. (2012). Desventajas de la introducción de la leche de vaca en el primer año de vida. *Acta Pediatr Mex* .31(3):123–

- Becerra Andrade RJ, Pulido Medellín MO, Porras Vargas JL. (2011). Efecto del amamantamiento restringido y la crianza artificial sobre la concentración de grasa en la leche de vacas Holstein cruzadas Revista. *Rev Científica, Venez* .11(2):156–61.
- Hurtado MP, de la Parte MA, Brito A. (2012). *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Rev Soc Ven Microbiol Caracas, Venez* .22(2).
- Akindolire MA, Kumar A, Ateba CN.(2015). Genetic characterization of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* from milk in the North-West Province, South Africa. *Saudi J Biol Sci. King Saud University*. 5 (11) Pág 45-53.
- Cuartas MC, Molina OL, Restrepo AC, Marín GP, Donado JH, Zuleta JJ, et al. (2009). Identificación rápida de *Staphylococcus aureus* en hemocultivos por medio de la prueba directa de la coagulasa. *latreia, Univ Antioquia*. 22(1):5–10.
- Victorio De los Santos L, Zorrilla H, Villalobos JM, Estrada R, Rodríguez M. (2007). Determinación de la sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivo aisladas de cultivo de exudado faringeo de alumnos del COBACH plantel 29 de Unión Juárez, Chiapas, México. *Bioquímica, México*.32:99.

Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos.(2010). Evaluación de riesgos de staphylococcus aureus enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. 1-74 p.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. (2010). Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Rev 13(1):16–34.

Cervantes-garcía E, García-gonzález R, Salazar-schettino PM. (2014). Características generales del Staphylococcus aureus. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 61(1):28–40.

Doyle, M., Beuchat, L. y Montville, T. (2001). Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras. Editorial Acribia. Zaragoza, España. Pág. 371-393.

Cabrera, M.P., Villa, J.F., Murillo, G. y Suárez, L.F. (2003). Como obtener leche de buena calidad.

Magariñes. H. (2000). Producción higiénica de la leche cruda. Producción y servicios incorporados. Valdivia, Chile.

Calderón, A., García, F. y Martínez, G. (2006). Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. Rev. MVZ Córdoba. 11:725- 737.

Switalski, L.M. (1976). Isolation and Purification of Staphylococcal Clumping Factor, Zbl. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg. I. Abt., Supplement 5, 413

11 ANEXOS

Controles Realizados en el laboratorio.

Para llevar a cabo el análisis microbiológico de las muestras analizar de la leche cruda, se realizó una serie de controles en el laboratorio, los cuales nos permitían tener una mejor confiabilidad a la hora de obtener los resultados y que estos no se viera afectados por la contaminación con partículas minúsculas.

Los controles tienen una gran importancia a la hora de llevar a cabo un análisis, ya que, por medio de estos, nos podemos asegurar de que se obtendrá una garantía de que los resultados sean verídicos.

Para efectuar este análisis, se determinó la flora ambiental en:

Nevera, incubadora, autoclave, y en la cabina de flujo laminar

Determinación de la flora ambiental en la nevera.

En la zona de la nevera, se situó una caja de agar nutritivo abierta por 15 minutos con el objetivo de obtener microorganismos de la flora ambiental que se encontraba allí. La caja se cerró y se dejó a 37° C por 24 horas en la incubadora

Análisis de la flora ambiental en la autoclave

Para esta prueba se utilizó una caja de agar nutritivo la cual se dejó abierta igualmente por 15 minutos con la finalidad de observar la posible contaminación que esta podía llegar a tener. La caja se cerró y se dejó a 37° C por 24 horas en la incubadora



Ilustración 9

Imagen 2. Control realizado en la autoclave (Fuente Propia)

Evaluación de la flora ambiental en la incubadora

En la zona de la incubadora, se situó una caja abierta por 15 minutos con la finalidad de obtener microorganismos los cuales se podrían albergar en aquel lugar; la caja se cerró y se dejó a 37°C por 24h, en este mismo lugar.



Ilustración 10

Imagen 3. Control realizado en la incubadora (fuente Propia)

Control de la flora ambiental de la cabina de flujo laminar.

En la zona de la cabina de flujo laminar, se ubicó en un costado dos cajas con agar nutritivo, con el objetivo de comprobar si realmente esta se encontraba libre de contaminación



Ilustración 11

Imagen 4. Control realizado en la cabina de flujo laminar (Fuente Propia)

