

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DETERMINACION DE LA MULTIRESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS EN
CEPA DE *Staphylococcus aureus*, AISLADA DE LECHE CRUDA DE VACA
OBTENIDA DE UNA LECHERIA DEL DEPARTAMENTO DE SANTA ANA.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

GUADALUPE DEL CARMEN ARRECES MARTINEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE, 2015.

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

DIRECCION DE PROCESO DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

TRIBUNAL CALIFICADOR

**COORDINADORA DE AREA DE GESTION AMBIENTAL: CALIDAD
AMBIENTAL**

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

COORDINADORA DE AREA: MICROBIOLOGIA

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

DOCENTE ASESORA

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

AGRADECIMIENTOS

A DIOS Y A SANTISIMA VIRGEN MARIA, por haberme guiado y bendecido en cada etapa de mi carrera universitaria.

DIRECTORA GENERAL:

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo por su valiosa colaboración en cada etapa de la evaluación de mi trabajo de graduación.

COORDINADORAS DE AREA:

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz y MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez, por su paciencia y por guiarme con sus observaciones y recomendaciones las cuales ayudaron a la realización de mi trabajo de investigación.

DOCENTE ASESORA:

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos, por ayudarme, guiarme y confiar en mi para trabajar con paciencia y comprensión durante la realización del trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) por brindarme la oportunidad de utilizar las instalaciones del laboratorio de análisis de alimentos.

A todas las personas que directa o indirectamente colaboraron en la realización de mi trabajo de graduación.

GRACIAS

DEDICATORIA

A DIOS, por ser mi sostén en los momentos más difíciles, por todas las bendiciones que me ha dado y por darme fortaleza, sabiduría necesaria para seguir adelante.

A MI MADRE, Ana Mercedes Martínez de Arreces por ser un pilar fundamental en mi vida, la persona más importante en mi vida. Gracias por enseñarme a ser perseverante y luchar hasta el final a pesar de las dificultades. Siempre tengo sus palabras de aliento y ánimo.

A MI PADRE, Henry Alfredo Arreces Martínez por enseñarme a leer y ayudarme con ello a emprender mis estudios con entrega y dedicación, siempre haciendo todo de la mejor manera posible y estar conmigo siempre siento el mejor padre.

A MIS HERMANOS, Alejandra María Arreces Martínez y Henri Alfredo Arreces Martínez, por apoyarme siempre y ser unos hermanos incondicionales.

INDICE

	Pág. Nº
Resumen	
Capítulo I	
1.0. Introducción	xxii
Capítulo II	
2.0. Objetivos	
Capítulo III	
3.0. Marco teórico	30
3.1. Definiciones	30
3.1.1. Leche	30
3.1.2. Leche cruda	30
3.1.3. Leche tratada térmicamente	31
3.2. Pasteurización	31
3.2.1. Tipos de pasteurización	31
3.3. Características físicas de la leche	32
3.4. Composición química de la leche	33
3.5. Calidad de la leche como materia prima	34
3.6. Buenas Prácticas de Ordeño	35
3.6.1. Requerimientos de condiciones higiénicas	35
3.7. Microorganismos presentes en la leche	38
3.7.1. Fuentes de contaminación de la leche	38
3.8. <i>Staphylococcus aureus</i>	39
3.9. Identificación del microorganismo	39
3.9.1. Método de conteo directo en placa	39
3.9.2. Prueba de coagulasa	40
3.10. Resistencia bacteriana	41
3.10.1. Prueba de susceptibilidad Método de Kirby Bauer	41

3.10.2. Fundamento teórico de la prueba de Kirby Bauer	42
3.10.3. Interpretación de resultados	42
3.11. Toxina estafilococcica	42
3.12. Importancia clínica del <i>Staphylococcus aureus</i>	44
3.13. Mastitis en el ganado vacuno	44
3.14. Microorganismos relacionados con la mastitis	45
3.15. Antibióticos en la leche	45
3.15.1. Antibióticos	45
3.15.2. Residuos de antibióticos en leche	46
3.16. Incidencia de los residuos de antibióticos en la salud pública	46
3.17. Descripción de la lechería	48
Capítulo IV	
4.0. Diseño Metodológico	50
4.1. Tipo de investigación	50
4.2. Investigación bibliográfica	51
4.3. Investigación de campo	52
4.4. Parte experimental	52
4.4.1. Selección y recolección de muestras	53
4.4.2. Identificación de la muestra	53
4.5. Aislamiento de la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> en muestras de leche cruda de vaca	53
4.5.1. Preparación de la muestra	53
4.5.2. Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>	53
4.5.3. Confirmación de colonias sospechosas de <i>Staphylococcus aureus</i>	54
4.6. Determinación de la multiresistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> a tres antibióticos diferentes	54
4.6.1. Preparación del medio de cultivo	54
4.6.2. Preparación del inóculo de <i>Staphylococcus aureus</i>	55

4.6.3.	Preparación de la suspensión del microorganismo	55
4.6.4.	Inoculación de <i>Staphylococcus aureus</i>	56
4.6.5.	Lectura de resultados	56
4.7.	Ensayo de control con cepa ATCC 29737 de <i>Staphylococcus aureus</i>	57 57
4.8.	Determinación de restos de antibióticos en leche cruda de vaca por medio del Kit SNAPduo Beta – Tetra ST Test	
4.8.1.	Procedimiento para la prueba	58
4.8.2.	Agregado de la muestra al dispositivo SNAP	58
4.8.3.	Interpretación de los resultados de la prueba	59
4.9.	Proceso de pasteurización a nivel de laboratorio de la leche cruda de vaca	59
4.9.1.	Proceso de Baja Temperatura Largo Tiempo (LTLT)	59
4.10.	Conteo y aislamiento de cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> en muestras de leche pasteurizada de vaca	60
4.10.1.	Preparación de la muestra	60
4.10.2.	Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>	60
4.10.3.	Confirmación de colonias sospechosas	60
4.10.4.	Conteo de colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> en leche pasteurizada	61
Capítulo V		
5.0.	Resultados	63
5.1.	Lista de chequeo para la verificación de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)	63
5.2.	Aislamiento y cuantificación de <i>Staphylococcus aureus</i> en muestras de leche pasteurizada para comparar si cumple con el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08	88
5.3.	Evaluación de la resistencia microbiana del <i>Staphylococcus aureus</i> por medio del método de Kirby Bauer	93

5.4.	Comparación de la multiresistencia a los antibióticos en <i>Staphylococcus aureus</i> cepa control ATCC 29737	106
5.5.	Determinación de la presencia o ausencia de restos de antibióticos en las muestras de leche cruda de vaca por medio del Kit rápido SNAPduo Beta – Tetra ST	108
Capítulo VI		
6.0.	Conclusiones	113
Capítulo VII		
7.0.	Recomendaciones	115
	Bibliografía	
	Glosario	
	Anexos	

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

- 1 Lista de chequeo
- 2 Viñeta para la identificación de muestras de leche cruda
- 3 Procedimiento para realizar el aislamiento y confirmación de colonias de cepa de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche cruda de vaca
- 4 Determinación de la multiresistencia a tres antibióticos diferentes en cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de leche cruda de vaca
- 5 Determinación de la multiresistencia a tres antibióticos diferentes en cepa control ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus*
- 6 Determinación de restos de antibióticos en leche cruda de vaca por medio del Kit SNAPduo Beta – Tetra ST Test
- 7 Proceso de pasteurización a nivel de laboratorio de leche cruda de vaca
- 8 Conteo y aislamiento de cepa de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche pasteurizada de vaca
- 9 Ubicación geográfica de la lechería
- 10 Verificación de las condiciones higiénicas de la lechería
- 11 Condiciones de estabulación del ganado: semi cerrada
- 12 Medicamentos más utilizados en la lechería para el tratamiento de la mastitis
- 13 Ubicación del tanque de almacenamiento de leche ordeñada
- 14 Aislamiento y cuantificación de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche pasteurizada para comparar si cumple con el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08.
- 15 Tabla de límites máximos permitidos de *Staphylococcus aureus* en

leche fluida pasteurizada.

- 16 Evaluación de la resistencia microbiana del *Staphylococcus aureus* por medio del método de Kirby Bauer
- 17 Tabla de parámetros para la interpretación de resultados, medida de los halos de inhibición
- 18 Comparación de la multiresistencia a los antibióticos de *Staphylococcus aureus* cepa control ATCC 29737
- 19 Descripción del cronograma de procesamiento de muestras y sus características organolépticas
- 20 Sensibilidad de límites detectables de antibióticos del Kit rápido SNAPduo Beta – Tetra ST
- 21 Certificado de análisis del Kit rápido SNAPduo Beta – Tetra ST
- 22 Estudios Inmunoserológicos realizados al plasma utilizado en la confirmación de colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* y cepa ATCC 29737

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°		Pág. N°
1	Propiedades físicas de la leche	31
2	Composición química media de la leche de vaca	32
3	Criterios de selección para condiciones higiénicas del personal	75
4	Criterios de selección para condiciones higiénicas de alrededores	77
5	Criterios de selección para condiciones higiénicas de operaciones sanitarias	79
6	Criterios de selección para condiciones higiénicas de equipo y utensilios	81
7	Criterios de selección para condiciones higiénicas de control de procesos	83

INDICE DE TABLAS

TABLA N°		Pág. N°
1	Tipo de ordeño realizado en la lechería	61
2	Materiales usados en el ordeño	62
3	Tipo de estabulación del ganado	63
4	Estancamiento de la leche	64
5	Enfermedades más frecuentes que padece el ganado	66
6	Medicamentos utilizados en la lechería para tratar la mastitis en el ganado	68
7	Condiciones de almacenamiento de la leche	70
8	Pruebas que se realizan a la leche cruda de vaca	72
9	Porcentaje de vacas y motivos por los cuales se les suspende el ordeño	73
10	Porcentaje de cumplimiento de criterios del personal	75
11	Porcentaje de cumplimiento de criterios para los alrededores	77
12	Porcentaje de cumplimiento de criterios de operaciones sanitarias	80
13	Porcentaje de cumplimiento de criterios para los equipos y utensilios	82
14	Porcentaje de cumplimiento de criterios para la producción y control de procesos	83
15	Resultados para el conteo de colonias para leche pasteurizada. Ensayo I	86
16	Resultados para el conteo de colonias para leche pasteurizada. Ensayo II	88
17	Medida de halos de inhibición de la Penicilina G	91
18	Medida de halos de inhibición de la Oxitetraciclina	94
19	Medida de halos de inhibición de la Tetraciclina	97

20	Muestras sensibles a los diferentes antibióticos	100
21	Muestras resistentes a los diferentes antibióticos	101
22	Medida de halo de inhibición de Penicilina G ante cepa ATCC 29737	103
23	Medida de halo de inhibición de Oxitetraciclina ante cepa ATCC 29737	104
24	Medida de halo de inhibición de Tetraciclina ante cepa ATCC 29737	104
25	Muestras analizadas para restos de antibióticos	107

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		Pág. N°
1	Gráfica de tipo de ordeño realizado en la lechería	61
2	Gráfica de porcentaje de estancamiento de leche	64
3	Gráfica de frecuencia de ordeño en la lechería	65
4	Control veterinario del ganado	66
5	Resultado de las enfermedades que afectan a las vacas	67
6	Medicamentos utilizados en la lechería para tratar la mastitis en el ganado	69
7	Control microbiológico de la leche cruda de vaca	71
8	Porcentaje de vacas a las que se les suspende el ordeño	73
9	Gráfica de porcentaje de cumplimiento de criterios del personal	76
10	Gráfica de porcentaje de cumplimiento de criterios para los alrededores	78
11	Gráfica de porcentaje de cumplimiento de criterios de operaciones sanitarias	80
12	Gráfica de porcentaje de cumplimiento de criterios para los equipos y utensilios	82
13	Gráfica de porcentaje de cumplimiento de criterios para la producción y control de procesos	84
14	Resultado de Resistencia Microbiana de las cepas aisladas de leche cruda de vaca ante P10U	93
15	Resultado de Resistencia Microbiana de las cepas aisladas de leche cruda de vaca ante OT30	96
16	Resultado de Resistencia Microbiana de las cepas aisladas de leche cruda de vaca ante TE30	99

17	Gráfica del antibiótico al que la cepa aislada de leche cruda de vaca mostró mayor sensibilidad	101
18	Gráfica del antibiótico al que la cepa aislada de leche cruda de vaca mostró mayor resistencia	102
19	Fotografía del Kit rápido SNAPduo Beta – Tetra ST	105
20	Utilización del Kit rápido SNAPduo Beta – Tetra ST	105
21	Fotografía de la lectura de resultados por medio del Kit rápido SNAPduo Beta – Tetra ST	106
22	Gráfica de porcentaje de muestras con ausencia o presencia de restos de antibióticos	108

ABREVIATURAS

BHI: Caldo Infusión Cerebro Corazón

BPA: Buenas Prácticas Agrícolas

CENSALUD: Centro de Investigación y Desarrollo en Salud

DNPC: Demasiado Numerosas para Contar

FD: Factor de Dilución

LCV: Leche Cruda de Vaca

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

OT30: Oxitetraciclina 30 UG

P10: Penicilina G 10 Unidades

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

TE30: Tetraciclina 30UG

TSA: Agar Tripticasa Soya

RESUMEN

Los residuos de antimicrobianos en la leche, son contaminantes químicos. En la salud del consumidor ocasionan e reacciones de hipersensibilidad, multiresistencia a bacterias patógenas al ser sometidas a bajas concentraciones sub – terapéuticas. En la industria láctea disminuyen la calidad de la leche, ya que los cultivos iniciadores empleados en la producción de derivados lácteos fermentados, tales como queso y yogurt, son extremadamente sensibles a bajas concentraciones de antibióticos en la leche.

Por lo tanto en este trabajo se determinó la multiresistencia a los antibióticos en cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de leche cruda de vaca obtenida en una lechería ubicada en el Municipio de El Porvenir, departamento de Santa Ana. Se realizó investigación de campo aplicando una lista de chequeo y verificando el cumplimiento de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Obteniendo información muy importante a cerca de las condiciones higiénicas de la lechería. Como son: el personal, alrededores, operaciones sanitarias, equipo y utensilios, producción y control de procesos. El método de muestreo fue no probabilístico, se tomaron 60 muestras provenientes de 15 vacas enfermas de mastitis y que habían sido tratadas con antibióticos habiendo cumplido el tiempo de retiro del antibiótico.

De cada una de las muestras de leche cruda se aisló e identificó la cepa de *Staphylococcus aureus*, para evaluar la resistencia microbiana a tres antibióticos más utilizados para el tratamiento de la mastitis. Por medio del Método de Kirby Bauer o Método de Difusión en Disco. La cepa mostró resistencia a la Oxitetraciclina y sensibilidad a la Penicilina G y a la Tetraciclina. Utilizando una cepa control ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus* se ensayó la resistencia microbiana y mostró ser sensible a los tres antibióticos.

La leche de vaca cruda se pasteurizó a nivel de laboratorio y se comparó con el límite microbiológico para *Staphylococcus aureus* establecido en el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08, para leche fluida pasteurizada. El 97.5 % de las muestras cumplió con la especificación encontrándose dentro del rango del límite máximo permitido.

Haciendo uso del Kit rápido SNAPduo Beta – Tetra ST Test se analizaron restos de antibióticos en leche cruda de vaca. La presencia de residuos de antibióticos fue positiva en el 27% de las muestras analizadas.

Las cantidades máximas permitidas en la ingesta de residuos de estos antibióticos según lo establece el Codex Alimentarius para residuos de Bencilpenicilina (residuo de Penicilina G) 30 µg, Tetraciclina y Oxitetraciclina 100 µg/Kg. Por lo tanto es recomendable evitar el uso indiscriminado de antibióticos para el tratamiento de mastitis respetando las dosis recomendadas cumpliendo adecuada y estrictamente los tiempos de retiro de antibióticos en las vacas lecheras enfermas de mastitis y tratadas con antibióticos, ya sea administrados por vía intramamaria o intramuscular.

El procesamiento y análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Microbiología en Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, en el mes de mayo de 2015.

1.0 INTRODUCCION

La leche cruda de vaca es un alimento con un alto valor nutricional que se procesa para obtener sus derivados.

Cuando se incumplen las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y se hace uso irracional de los antibióticos para el tratamiento de la mastitis la leche pierde su calidad y hay incidencia negativa en la salud de la vaca, del consumidor y en la industria láctea. El enfoque de esta investigación consistió en analizar muestras de leche cruda de vaca obtenida de una lechería ubicada en el Municipio de El Porvenir, departamento de Santa Ana, El Salvador. Se realizó investigación de campo, para realizar la lista de chequeo y verificar el cumplimiento de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la lechería. El método de muestreo empleado fue no probabilístico y se realizó tomando como universo a todas las vacas de la lechería siendo un total de 60 vacas, la muestra se constituyó por la leche cruda de 15 vacas enfermas de mastitis, tratadas con antibióticos y que habían cumplido el tiempo de retiro. Se aisló y cuantificó *Staphylococcus aureus* a partir de leche cruda de vaca, a esta cepa aislada se le determinó por medio del Método de Kirby Bauer o Método de Difusión en disco; la multiresistencia a tres de los antibióticos más usados en el tratamiento de la mastitis: Penicilina G, Oxitetraciclina y Tetraciclina. Simultáneamente se realizó con una cepa ATCC 29737 para comparar la multiresistencia. Por medio del Kit rápido SNAPduo Beta – Tetra ST Test se determinó restos de antibióticos en muestras de leche cruda. La leche cruda pasó por un proceso de pasteurización a nivel de laboratorio, a partir de ella se cuantificó *Staphylococcus aureus* para comparar si los resultados cumplen con los límites microbiológicos para leche fluida pasteurizada, establecidos en el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de análisis de alimentos de CENSALUD.

CAPITULO I
INTRODUCCION

2.0. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la multiresistencia a los antibióticos en cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de leche cruda de vaca obtenida en una lechería del Departamento de Santa Ana.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1. Investigar a través de una lista de chequeo las condiciones higiénicas de la lechería ubicada en la ciudad de Santa Ana.
- 2.2.2. Aislar y cuantificar *Staphylococcus aureus* en muestras de leche pasteurizada para comparar si cumple con el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08.
- 2.2.3. Evaluar la resistencia microbiana del *Staphylococcus aureus* por medio del método de Kirby Bahuer.
- 2.2.4. Comparar con una cepa control ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus* la multiresistencia a los diferentes antibióticos.
- 2.2.5. Comprobar la presencia o ausencia de restos de antibióticos en las muestras de leche cruda de vaca por medio del Kit rápido SnapDuo Tetra-Beta ST.

CAPITULO II
OBJETIVOS

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0. MARCO TEORICO

3.1. Definiciones

3.1.1. Leche

“Es el producto íntegro, no alterado ni adulterado de la secreción de las glándulas mamarias de las hembras del ganado bovino obtenida por el ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de vacas sanas y libre de calostro; que no ha sufrido ningún tratamiento a excepción del filtrado y/o enfriamiento, y está exento de color, olor, sabor y consistencia anormales” ⁽⁶⁾.

Las leches destinadas al consumo humano existentes actualmente pueden clasificarse en dos categorías, según el tratamiento al que hayan sido sometidas:

- Leche cruda: sin tratamiento térmico;
- Leche tratada térmicamente ⁽⁶⁾.

3.1.2. Leche cruda

La leche cruda es un producto interesante bajo el punto de vista de la nutrición, y como no ha sufrido ningún tratamiento de saneamiento que le permita asegurar una mejor conservación, su producción y su comercialización deben de ser severamente controladas para evitar los riesgos que pudiesen ocasionar en la salud.

Para ello debe:

- Provenir de animales exentos de brucelosis y tuberculosis (enfermedades transmisibles del animal al hombre) dentro del cuadro de la profilaxis colectiva obligatoria.
- De explotaciones bien establecidas.
- Manipularse (ordeño, envasado, almacenamiento) en condiciones higiénicas satisfactorias.

- Cumplir unos criterios microbiológicos determinados (testigos de la contaminación) hasta la fecha límite de consumo.⁽¹⁶⁾

El *Staphylococcus aureus* es altamente vulnerable a la destrucción por el tratamiento térmico y casi todos los agentes desinfectantes. Así que la presencia de esta bacteria o sus enterotoxinas en los alimentos procesados o en equipos de procesamiento de alimentos es en general una indicación de la falta de saneamiento.⁽²⁴⁾

3.1.3. Leche tratada térmicamente

Según el grado de tratamiento térmico, que permite aumentar el tiempo de conservación.⁽¹⁶⁾

3.2. Pasteurización⁽¹⁷⁾

El proceso de pasteurización es idóneo para disminuir microorganismos saprofitos y la totalidad de los agentes microbianos patógenos, pero sin alterar en lo mínimo posible la estructura física y química de la leche y las sustancias con actividad biológica tales como enzimas y vitaminas. La temperatura y tiempo aplicados en la pasteurización aseguran la destrucción de los agentes patógenos.

3.2.1. Tipos de pasteurización⁽¹⁷⁾

- **Ultrapasteurización o Ultra High Temperature (UHT)**

Consiste en someter el alimento a una temperatura cercana a los 138°C, durante un período de al menos dos segundos. Este breve período de exposición produce una mínima degradación del alimento y de sus propiedades organolépticas. Si bien es un proceso que produce alimentos de calidad y con vida prolongada en anaquel, requiere un equipo complejo y una planta para empaque aséptico

(materiales de empaque, tanques, las bombas, etc.), además, operarios más experimentados y esterilidad en el empaque aséptico.

- **Ultrapasteurización instantánea o High Temperature Short Time (HTST)**

Este método consiste en someter el alimento a una temperatura cercana a los 79°C, durante un período de al menos 15 segundos. Se emplea en la pasteurización de líquidos a granel como leche, zumos de fruta, cerveza, etc. Presenta, entre otras ventajas, tiempos cortos de producción, equipo menos complejo que el UHT y permite el procesamiento de lotes pequeños.

- **Pasteurización lenta o VAT**

Fue el primer método de pasteurización, aunque la industria alimenticia lo ha ido renovando por otros sistemas más eficaces que reducen los costos de producción. El proceso consiste en calentar grandes volúmenes de líquido en un recipiente estanco a 63 °C, durante 30 minutos, para luego dejar enfriar lentamente. Pueden necesitarse hasta 24 horas para continuar con el proceso de envasado del producto.

3.3. Características físicas de la leche

Algunas propiedades físicas dependen del total de los componentes: densidad, tensión superficial y calor específico; otras dependen de las sustancias disueltas: índice de refracción, punto de congelación y hay otras que solo dependen de los iones: pH y conductividad. ⁽⁴⁾

Cuadro N°1 Propiedades físicas de la leche. ⁽⁴⁾

Propiedades físicas	Valores
Densidad de la leche completa (g/ml)	1.032
Densidad de la leche descremada (g/ml)	1.036
Densidad de la materia grasa (g/ml)	0.940
Poder calórico (por litro), calorías	700.0
Ph	6.6 – 6.8
Conductividad eléctrica, mhos	45×10^{-4}
Tensión superficial (dinas/cm/15°)	53.0
Viscosidad absoluta (15°)	0.0212 – 0.0354
Viscosidad específica	1.6 – 2.15
Índice de refracción	1.35
Punto de congelación	-0.55
Calor específico	0.93

3.4. Composición Química de la leche

Su composición química es muy compleja y completa, lo que refleja su gran importancia en la alimentación. La propiedad fundamental de la leche es la de ser una mezcla tanto física como química. Es una mezcla de sustancias definidas: lactosa, glicéridos de ácidos grasos, caseína, albúmina, sales, etc. Desde el punto de vista físico coexisten varios estados; emulsión, suspensión y solución. ⁽⁴⁾

La composición química media de la leche de vaca son las siguientes:

Cuadro N°2 Composición química media de la leche de vaca. ⁽⁴⁾

Constituyentes	Porcentajes
Agua	87.0 %
Grasas	3.8 %
Proteínas	3.5 %
Lactosa	4.9 %
Minerales	0.8 %

Aproximadamente el 85.0% de la leche es agua. La grasa es insoluble en agua y por ello se encuentra en la leche en forma de glóbulos grasos formando una emulsión. Después de cierto tiempo, la grasa se estratifica en forma de nata.

La grasa de la leche es una de las grasas alimenticias más fácilmente digerible, es rica en energía y contiene vitaminas A, D y E. La cantidad de grasa en la leche es variable y esto depende de la raza y de la alimentación de la vaca. La grasa contribuye mucho al sabor y a las propiedades físicas de la leche y de los productos lácteos.

Las proteínas en la leche son la caseína, la albúmina y la globulina, estas son proteínas de alta calidad y son utilizadas en el desarrollo de los músculos y en el sustento del cuerpo. La lactosa da el sabor dulce a la leche, es un alimento de gran energía, el cual es absorbido lenta y uniformemente en el tubo digestivo.

Las sales minerales o cenizas de la leche son cloruros, fosfatos, sulfatos, carbonatos y citratos. Los minerales principales son calcio, sodio, potasio, magnesio y hierro. Los minerales de la leche son los más necesarios para el crecimiento y mantenimiento de los huesos y se encuentran en la debida proporción, la cual varía en casos de enfermedades en la vaca. Aumenta el cloruro sódico y disminuye las demás sales. ⁽⁴⁾

3.5. Calidad de la leche como materia prima

La materia prima es fundamental en la elaboración de cualquier producto de alimentación. Los problemas relacionados a la industria láctea están directamente ligados a la pérdida de la calidad de la leche, afectando mayormente a los productos fermentados, fabricación y maduración del queso;

los residuos de antibiótico por tanto, provocan demora en la acidificación y coagulación, siendo ésta última deficiente; además hay disminución de la retención de agua, se puede dar el desarrollo de microorganismos indeseables y alteración de las características normales del producto, tales como cuerpo débil, textura blanda, sabor amargo y consistencia arenosa, además, reduce la producción normal de acidez y aroma durante la fabricación de la mantequilla y el yogurt. Otra consecuencia de la presencia de antibióticos en la leche cruda es la inhibición de bacterias que participan en los procesos de obtención de derivados de leche, queso, crema, yogurt y otros, produciendo pérdidas para la industria.

Los estreptococos mesófilos lácticos, son parcialmente inhibidos a concentraciones de 0.1 ng/ml y totalmente inhibidos a concentraciones de 0.2 ó 0.3 ng/ml. Los *Streptococcus thermophilus* y los *Lactobacillus*, son 10 veces más susceptibles a la penicilina, que los *Streptococcus* mesófilos. ⁽²⁾

3.6. Buenas Prácticas de Ordeño

La aplicación de las Buenas Prácticas de Ordeño (BPO) en la finca productora de leche, involucra la planificación y realización de una serie de actividades, que contribuyen con el cumplimiento de los requisitos mínimos para producir leche apta para el consumo humano y su adecuado procesamiento en la elaboración de productos lácteos para obtención de productos seguros para el consumo humano. ⁽¹²⁾

3.6.1. Requerimientos de Condiciones Higiénicas

Edificios e instalaciones

Los corrales casi siempre se ensucian por la presencia de estiércol,

desperdicios de alimentos, polvo, lodo, orina, agua, etc. Por ello se recomienda:

- Evitar acumulación de estiércol y se debe mantener el corral lo más limpio posible.
- Utilizar desagües amplios conectados a piletas y mantenerlos destapados.
- Las vacas, antes del ordeño, deben estar en un corral de espera, que debe estar limpio y seco, sin desperdicios que les molesten o provoquen la subida de la leche.

Equipos y utensilios

Todos los equipos que se usan en el ordeño, como los coladores, pichingas y baldes, son posibles fuentes de contaminación, ya que sirven para la extracción y el traslado de la leche. Por eso, se debe tener bastante cuidado en la limpieza de todos los equipos para eliminar todos los microorganismos que pueden afectar la calidad de la leche. Para ello se recomienda lo siguiente:

- Lavar las pichingas con jabón, agua clorada y agua.
- Las pichingas y baldes deben ser de una sola pieza y preferiblemente, de acero inoxidable, para asegurar un buen lavado, que no queden residuos y que no transmiten malos olores a la leche.

Personal y manipulador

Higiene personal

Las personas que participan en el ordeño son el ordeñador y el enrejador, y cada uno debe tener claro su trabajo.

El enrejador:

Debe hacer pasar el ternero al corral, dejar que se pegue a la vaca y enrejarla.

El ordeñador:

Para llevar a cabo el ordeño manual el ordeñador debe cumplir los siguientes requisitos:

- Lavarse bien las manos con agua y jabón.
- Realizar el lavado y el secado de la ubre.
- Enjuagarse las manos con agua clorada antes de iniciar el ordeño y después de ordeñar cada vaca.
- Estar libre de: tos, gripe, heridas en las manos u otra enfermedad.

Almacenamiento y distribución

La leche es una materia prima que se contamina fácilmente y de forma acelerada, la mayor parte de la leche que se obtiene en las fincas no es trasladada inmediatamente después del ordeño a la planta de procesamiento, porque es recolectada por rutas de leche y es expuesta a distintas condiciones que la podrían deteriorar. El equipo de almacenamiento debe tener capacidad para mantener la leche a la temperatura requerida hasta el momento de la recolección.

Los sistemas de refrigeración deben tener procedimientos de calibración, mantenimiento preventivo y acciones correctivas, manteniéndose los registros apropiados.

Los tanques deben estar equipados con un termómetro para controlar la temperatura de la leche y mantener los registros apropiados de la temperatura de almacenamiento. Asegurarse de que todo el equipo funciona adecuadamente.

El transportista

Durante el transporte de la leche se deben tomar medidas higiénicas para evitar su contaminación y mientras esta actividad se realice, los vehículos serán exclusivos para el transporte de la misma. ⁽¹²⁾

3.7. Microorganismos Presentes en la Leche

3.7.1. Fuentes de contaminación de la leche

Ubre

Cuando la leche sale de la ubre de la vaca sana contiene relativamente pocas bacterias y, generalmente, estas bacterias no se multiplican en la leche que se manipula bajo condiciones normales. No obstante, en la leche ordeñada asépticamente, se ha aislado micrococcos y estreptococos. Sin embargo, durante la operación normal del ordeño la leche está expuesta a la contaminación por microorganismos del propio animal, sobre todo por los existentes en la parte externa de la ubre y zonas próximas a la misma. Esta contaminación se reduce lavando la ubre con una solución germicida antes de proceder al ordeño. ⁽¹⁰⁾

Personal

Las vías nasales de las personas están cargadas de estafilococos que producen intoxicaciones alimentarias, estos causan una corriente de infecciones de los senos nasales. En el ser humano se localiza en las fosas nasales que son su reservorio principal (se encuentra entre un 20 a un 50% de sujetos sanos) de allí su dependencia a cara, manos y piel.

Ambiente

Bacterias encontradas en el estiércol, en el suelo y el agua, pueden llegar a la leche a partir de esta fuente de contaminación. ⁽¹⁰⁾

Equipo

Probablemente las fuentes más importantes de contaminación son los utensilios de ordeño y las superficies que entran en contacto con la leche. Si no se limpian, desinfectan, y secan convenientemente, es posible que las bacterias se

multipliquen abundantemente en los restos de leche y después contaminen la demás leche. Entre las bacterias indeseables que tienen las procedencias antes mencionadas se incluyen los estreptococos lácticos, las bacterias coliformes, los bacilos psicrotrofos gramnegativos, y las bacterias termodúcticas, es decir aquellas que resisten la pasteurización, como son por ejemplo: los micrococcos, los enterococos, los bacilos, y las brevibacterias. ⁽¹⁰⁾

3.8. *Staphylococcus aureus*

Es un coco grampositivo, pertenece a la familia micrococcaceae, aerobio o anaerobio, inmóvil, no esporulante, con actividad catalasa y coagulasa positivos, estos generalmente producen enterotoxina, no obstante, no todos los estafilococos coagulasa - positivos son necesariamente enterotoxigénicos.

Generalmente se dispone en racimos irregulares semejantes a los de uvas, en parejas o en forma de cadenas cortas.

Sobre medios sólidos crece dando colonias que suelen ser de color dorado o amarillo, aunque es posible que algunas carezcan de pigmento, con apariencia cremosa y brillante.

Los medios diferenciales que se utilizan son: Medio Manitol - Salino o Chapman y el medio Baird Parker. El medio Baird Parker se usa para la realización del contero de colonias. ⁽¹⁰⁾

3.9. Identificación del microorganismo

3.9.1. Método de conteo directo en placa

Este método es adecuado para el análisis de alimentos en los que más de 100 *Staphylococcus aureus* células / g se puede esperar. El método consiste en una inoculación directa sobre la superficie de la placa con Agar Baird Parker, el cual se homogeniza con ayuda de una varilla de vidrio. ⁽²⁴⁾

3.9.2. Prueba de Coagulasa

El plasma de conejo (o humano) citrado diluido 1:5 se mezcla con un volumen igual de caldo de cultivo o del cultivo proveniente de colonias crecidas en agar y se incuba a una temperatura de 37°C grados. Se incluye como control un tubo de ensayo con plasma mezclado con caldo estéril. Si se forma coágulos en un lapso de 1 a 4 horas, la prueba es positiva. ⁽²⁴⁾

3.10. Resistencia bacteriana

Staphylococcus aureus tiene resistencia mediante una beta lactamasa inducible que le confiere resistencia ante la penicilina, esta beta lactamasa esta codificada en un plásmido presente en más del 90% de las cepas.

Los estafilococos muestran susceptibilidad variable ante muchos antimicrobianos. La resistencia puede clasificarse en varios tipos:

La producción de β -lactamasa bajo el control de un plásmido es común y confiere al microorganismo resistencia a muchas penicilinas (penicilina G, ampicilina, ticarcilina y fármacos similares).

La resistencia a la nafcilina (a meticilina y oxacilina), es independiente de la producción de β -lactamasa. El gen *mecA* de la resistencia a la nafcilina reside en el cromosoma. El mecanismo de resistencia a la nafcilina se vincula con ausencia o inaccesibilidad de ciertas proteínas de enlace a la penicilina (PBP) en los microorganismos.

La tolerancia implica que un fármaco inhibe los estafilococos pero no los mata. Es decir, hay una diferencia muy grande entre la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de un antimicrobiano. La tolerancia puede atribuirse a la falta de activación de las enzimas autolíticas de la pared celular.

Los plásmidos también pueden ser portadores de genes de resistencia a las tetraciclinas, eritromicinas, aminoglucósidos y otros fármacos. Todos, salvo

algunas cepas de estafilococos, aún son susceptibles a la vancomicina. ⁽⁴⁾

3.10.1. Prueba de Susceptibilidad Método de Kirby Bauer

El antibiograma disco - placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. ⁽¹¹⁾

3.10.2. Fundamento teórico de la prueba de Kirby Bauer

El antibiograma disco - placa consiste en depositar, en la superficie de Agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración.

Transcurridas 18 - 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de las cepas.

Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición dados en mm y expresados en tablas, estandarizados para cada antimicrobiano. Haciendo uso de estas tablas de la NCCLS se puede realizar la lectura de los halos de inhibición. Interpretándose los resultados de la siguiente manera, como: Sensible (S), Intermedia (I) o Resistente (R) según las categorías establecidas. ⁽¹¹⁾

3.10.3. Interpretación de Resultados ⁽¹¹⁾

- **Resistente**

Significa que el organismo no sería inhibido por el antibiótico en las dosis habituales o que el organismo tiene mecanismo de resistencia contra ese determinado antibiótico.

- **Susceptible**

Indica que la infección causada por ese organismo puede ser apropiadamente tratada con las dosis habituales del antibiótico estudiado.

- **Sensibilidad Intermedia**

Esta categoría incluye organismos que son inhibidos por concentraciones del antibiótico que están muy cercanas a las alcanzadas en el plasma, por lo que pueden responder pobremente a la terapia.

3.11. Toxina Estafilococcica ⁽¹⁰⁾

Las toxinas estafilocócicas son proteínas de cadena simple no ramificadas compuestas por cantidades relativamente grandes de lisina, tirosina, ácido aspártamico y ácido glutámico. Con pesos moleculares comprendidos entre 26,000 y 30,000. Las cadenas sencillas de polipéptidos están unidas entre sí por puentes disulfuro para formar el característico bucle de cistina.

Los tipos de enterotoxina A y D son los que con mayor frecuencia se relacionan con brotes de intoxicaciones alimentarias.

Las concentraciones elevadas de enterotoxina sólo se producen después de una abundante multiplicación de estafilococo; para que se produzca enterotoxina se debe obtener una población de por lo menos varios

millones de microorganismos por mililitro o por gramo. Por consiguiente, las condiciones que favorecen la producción de toxina son las mejores para que tenga lugar la multiplicación del estafilococo.

La toxina se produce con una rapidez notable a temperaturas comprendidas entre 15,6 y 46,1 °C y la producción es óptima a 40 °C. En condiciones óptimas, la enterotoxina se puede poner de manifiesto entre las 4 y las 6 horas. A un pH de entre 6.5 - 7.3. Cuando más baja sea la temperatura durante la multiplicación, tanto más tiempo tardará en producirse la suficiente cantidad de enterotoxina que origine la intoxicación.

Existe mayor probabilidad de que los estafilococos produzcan enterotoxina cuando no existen microorganismos competitivos, cuando estos son pocos, o cuando por alguna razón están inhibidos.

Se ha comprobado que los estafilococos que crecen en el tracto gastrointestinal de los enfermos producen la toxina cuando el tratamiento con antibióticos ha destruido o inactivado otras bacterias competitivas allí existentes.

3.12. Importancia clínica del *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* tiene gran importancia clínica. Casi todas las personas presentan algún tipo de infección por *Staphylococcus aureus* durante su vida, la cual fluctúa en gravedad desde una intoxicación alimentaria o infecciones cutáneas leves hasta infecciones graves que ponen en riesgo la vida. ⁽¹⁰⁾

Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* producen enterotoxinas mientras proliferan en carnes, productos lácteos y otros alimentos. En los

casos típicos, el alimento se ha preparado recientemente pero no se ha refrigerado en la forma adecuada.

Existen cuando menos seis tipos de enterotoxina estafilocócica. Una vez que se ingiere la toxina preformada, se absorbe en el intestino, donde estimula a los receptores nerviosos. Este estímulo es transmitido al centro del vómito en el sistema nervioso central. El resultado es la aparición de vómito en unas cuantas horas, el cual a menudo es en forma de proyectil. La diarrea es menos frecuente. La intoxicación alimentaria más frecuente es la estafilocócica. Las enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* son superantígenos. ⁽⁴⁾

3.13. Mastitis en el ganado vacuno

La mastitis bovina es una enfermedad infecto - contagiosa de la glándula mamaria, en la cual la inflamación se produce como respuesta a la invasión, a través del canal del pezón, de diferentes tipos de bacterias, micoplasmas, hongos, levaduras y hasta algunos virus. Sin embargo, las bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y algunos gérmenes Gram (-), son responsables de más del 90 % de los casos clínicos y subclínicos. ⁽⁷⁾

3.14. Microorganismos relacionados con la mastitis ⁽⁷⁾

El *Staphylococcus aureus* está fundamentalmente asociado a ubres infectadas, lesiones de los pezones y colonización del canal del pezón, transmitiéndose de vaca a vaca y de cuarto a cuarto al momento del ordeño o poco después.

Las infecciones naturales por *Staphylococcus aureus* generalmente persisten por períodos largos de tiempo antes de llegar a producir casos

clínicos. La infección por *Staphylococcus aureus* es típicamente crónica. En las infecciones por *Staphylococcus aureus*, al comienzo se verán dañadas sólo pequeñas áreas del cuarto afectado, con pérdida funcional de los alvéolos involucrados. Las células de los alveolos y pequeños conductos mamarios degeneran, mueren y son descamados. Este material, más los leucocitos, fibrina, etc., producen coágulos que bloquean a los conductos mayores, impidiendo la remoción de la leche que proviene de áreas aún funcionantes.

El no poder sacar esta leche trae consecuencias negativas. La leche residual “atrapada” se transforma en un medio de cultivo ideal para que progrese la infección. Los conductos cerrados pueden, de tanto en tanto, reabrirse, liberando bacterias a otras partes del cuarto infectado. Este proceso se repite una y otra vez en cuestión de días o semanas, perpetuando un ciclo continuo de infecciones en áreas vecinas.

3.15. Antibióticos en leche

3.15.1. Antibiótico

Un antibiótico puede definirse como una sustancia derivada de un organismo vivo, generalmente un microorganismo, o una modificación química de la misma, que inhibe la reproducción, del crecimiento o incluso, destruye otros microorganismos y células anormales de animales superiores. ⁽²²⁾

3.15.2. Residuos de antibióticos en leche ⁽²⁹⁾

Los antibióticos y otras sustancias antimicrobianas se utilizan ampliamente en los tratamientos de la mastitis. Se administran por vía intramamaria, llegando al cuarterón afectado a través del canal del

pezón. Se aplica un amplio rango de medicamentos en el tratamiento de la mastitis, entre ellos la Penicilina G, Ampicilina, Tetraciclinas y Sulfamidas, como la Sulfametazina.

Los residuos persisten en la leche hasta cuatro días después de la administración de un tratamiento de mastitis.

Los antibióticos también son muy utilizados en el tratamiento profiláctico de las vacas no lactantes y, en este caso, pueden ser excretados elevados niveles de residuos durante largos periodos después del parto.

Se debe fomentar con los ganaderos, y en algunos casos a los veterinarios, en el uso responsable de los antibióticos y otras sustancias antimicrobianas. Se ha ido estudiando con mayor interés, puesto que ha sido necesario establecer un criterio muy estricto en cuanto al límite máximo de residuos. El uso de antibióticos en las explotaciones ganaderas es una realidad y una necesidad, sin embargo, al aplicar tales fármacos se debe contar con una dosis, vía de administración, período de retiro adecuado y apropiada identificación de vacas en tratamiento para evitar contaminación accidental de la leche procedente de vacas sanas, además se debe identificar el motivo principal para usarlos y tomar las medidas adecuadas para disminuir el uso de éstos.

El uso excesivo e inapropiado de los antibióticos, ha logrado el aumento de microorganismos resistentes.

3.16. Incidencia de los residuos de antibióticos en la salud pública ⁽²⁾

Los residuos de antibióticos en leche son perjudiciales. Al ingerir alimentos contaminados con estos representan un peligro para la salud, porque son capaces de producir una toxicidad de tipo crónica, causar reacciones alérgicas de distintas magnitudes, efectos carcinogénicos,

pueden estimularse bacterias antibiótico resistentes y en consecuencia el desarrollo de microorganismos patógenos, además puede causar la reducción de la síntesis de vitaminas; por otro lado, pueden presentarse irritaciones digestivas, entre otras.

La resistencia bacteriana podría llegar a considerarse también como un problema ecológico, ya que se sabe que son resistentes a algunos antibióticos no afectan solamente a las personas que están siendo tratadas, sino a otros individuos que comparten el ambiente con éstas.

En el caso de ingerir leche con residuos de antibióticos β -lactámicos pueden provocar reacciones adversas como erupciones maculopapulares, urticaria, fiebre, broncoespasmo, vasculitis, dermatitis exfoliativa y anafilaxia en distintos grados, pudiendo causar graves reacciones en personas hipersensibles tan solo con ingerir 40 UI de algún tipo de penicilina.

Al consumir leche contaminada con residuos de tetraciclinas pueden provocarse reacciones adversas como dolor epigástrico y abdominal, náuseas, vómitos, diarreas, en personas hipersensibles al antibiótico se puede presentar fotosensibilidad por exposición cutánea al sol, en lactantes prematuros o niños en estado de desarrollo óseo y dentario acelerado, puede causar alteraciones y disminución del crecimiento óseo, por sus propiedades quelantes de calcio y otros cationes, formando compuestos estables que interfieren en la osificación y dentición normal, sin embargo, esta situación no parece ser un fenómeno frecuente y puede ser reversible si la exposición fue durante poco tiempo.

3.17. Descripción de la lechería

La ganadería tiene como actividad primaria dedicarse a la domesticación y cría de animales para que sus productos y ellos puedan ser consumidos por las personas. La lechería está ubicada en la calle que conduce de Santa Ana al municipio de El Porvenir, geográficamente esta en las siguientes coordenadas: 14.002934 - 89.645380.

La lechería se puede clasificar como extensiva ya que esta se caracteriza por la crianza de ganado en ecosistemas naturales y que han recibido ciertas modificaciones hechas por el hombre para adecuar las condiciones de limpieza e idóneas para que se desarrollen de mejor manera los animales.

Estas condiciones adecuadas y modificadas por el hombre son lo que permiten utilizar el territorio por largos períodos de tiempo ya que dependen de los ciclos naturales. En esta forma de ganadería las vacas se alimentan de concentrado y pastizales, además consumen abundante agua potable.

El tipo de ordeño que se practica es: ordeño automatizado, siguiendo las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). El ganado que presenta mastitis es tratado con antibióticos el que se usa actualmente es la Oxitetraciclina, por vía intramamaria. La persona encargada del ganado es quien se administra la dosis del medicamento. Y por experiencia empírica han llegado a la conclusión de utilizar ese antibiótico en el tratamiento de mastitis que la detectan en las vacas por simple inspección de las características de la leche, la ubre y principalmente el cuarterón afectado.

La leche que producen es utilizada para la venta y distribución en la industria, a la empresa LACTOSA, para la elaboración de derivados de la leche.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0. DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

Transversal

Se hizo la investigación durante los meses de abril y mayo de 2015 para determinar la calidad de la leche de vaca cruda y pasteurizada.

Experimental

Se aisló la de cepa de *Staphylococcus aureus*, en muestras de leche cruda, para determinar la multiresistencia a tres antibióticos utilizados en el tratamiento de mastitis en vacas. Usando la cepa control ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus* se comparó la multiresistencia ante los tres antibióticos.

Las muestras de leche cruda de vaca se pasteurizaron a nivel de laboratorio y se realizó el conteo y aislamiento de *Staphylococcus aureus* para comparar si cumple con los criterios establecidos por el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08. Se determinó la presencia o ausencia de restos de antibióticos en muestras de leche cruda de vaca. Las muestras recolectadas en una lechería ubicada en el Municipio de El Porvenir, Departamento de Santa Ana, fueron en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

4.2 Investigación bibliográfica

Se realizó en libros, revistas y tesis, en las bibliotecas de:

- Facultad de Química y Farmacia, “Dr. Benjamín Orozco”, Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador.

- Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.
- Internet

4.3 Investigación de campo

Universo

Todas las vacas lecheras que se ordeñan en la lechería, siendo un total de 60 vacas.

Muestra

El número de vacas muestreadas se eligió por medio de un método estadístico no probabilístico, bajo criterios específicos. Se tomaron muestras únicamente de 15 vacas las cuales habían estado bajo tratamiento con antibióticos. Las muestras se constituyeron por la leche de cada cuarterón de la ubre de la vaca. Haciendo un total de 60 muestras. La recolección de muestras se realizó durante el ordeño.

Estudio preliminar

Haciendo uso de una lista de chequeo con el fin de verificar las condiciones higiénicas de las instalaciones y del proceso de ordeño en la lechería. (Ver Anexo N°1.

Se llevaron a cabo dos visitas a las instalaciones de la lechería seleccionada, ubicada en el Municipio de El Porvenir, Departamento de Santa Ana.

4.4 Parte experimental

4.4.1 Selección y recolección de muestras

Para la toma de muestras se seleccionaron todas las vacas que estuvieron enfermas de mastitis y recibieron tratamiento con antibióticos debido. Se tomó una muestra por cada teta. Estas muestras se recolectaron en condiciones de asepsia para que la prueba fuese más sensible y se recogieron por separado en recipientes de plástico previamente esterilizados.

El muestreo se realizó con la finalidad de detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* responsable de mastitis.

La identificación de cada muestra se hizo por medio de una viñeta con la información necesaria. (Ver Anexo N°2)

El procedimiento para la toma de muestra se realizó de la manera siguiente:

- Se lavó la ubre de la vaca con agua jabonosa y se enjuagó con agua potable.
- Posteriormente se secó el cuarterón con un algodón hidrófilo estéril.
- La muestra se extrajo por medio de ordeño manual tras un minucioso lavado de las manos por parte de la persona encargada de realizar el ordeño.
- La leche de cada muestra se recolectó directamente en un frasco de plástico, previamente esterilizado e identificado con una etiqueta correspondiente a la muestra.

Se recogieron de 50 a 100 ml de leche cruda de vaca. Para realizar el examen bacteriológico se tomaron 25 ml de leche cruda y para determinar la presencia o ausencia de residuos de antibióticos una alícuota de 450 – 50 µL.

4.4.2 Identificación de las muestras

Las muestras se identificaron por medio de una viñeta. Cada viñeta con un número correlativo partiendo del 1 anteponiendo el código LCV. (Ver Anexo N°2)

4.5 Aislamiento de cepa de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche cruda de vaca (Ver Anexo N°3)

4.5.1. Preparación de la muestra (Ver Figura N° 23)

- Pipetear 25 ml de leche cruda de vaca
- Transferir a un frasco de dilución conteniendo 225 ml de solución de Agua Peptonada Bufferada (pH 7.2)
- Agitar por 5 minutos (Dilución 10-1)

4.5.2. Determinación de *Staphylococcus aureus* (Ver Figura N°23)

- Agitar la muestra fuertemente (Dilución 10-1).
- Pipetear en 3 placas de petri 0.3 ml, 0.3 ml y 0.4 ml de la muestra y colocarlo respectiva ente en cada placa conteniendo Agar Baird Parker.
- Esparcir con un asa en “L”.
- Incubar las placas a 35-37°C por 24-48 horas.
- Observar el desarrollo de colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* de aspecto negro brillante o gris oscuro, con formación de halo alrededor de la colonia.

4.5.3. Confirmación de colonias sospechosas *Staphylococcus aureus* (Ver Figura N°25)

- Seleccionar 5 colonias negras, redondas, brillantes y con halo del Agar Baird Parker.
- Tomar con un asa
- Sembrar en un tubo con Caldo Infusión Cerebro Corazón.
- Incubar a 35 ± 2 °C por 24 horas
- Tomar 0.5 ml del Caldo Infusión Cerebro Corazón inoculado con el microorganismo.
- Sembrar en 0.5 ml de un tubo con plasma
- Incubar a 35 ± 2 °C por 24 horas
- Observar la formación de un coagulo, que no se deshace al invertir el tubo. Esto indica prueba positiva (+).

4.6 Determinación de la multiresistencia del *Staphylococcus aureus* a tres antibióticos diferentes (Ver Anexo N°4)

4.6.1. Preparación del medio de cultivo en placas de Petri

- El Agar Mueller Hinton se preparó a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- Inmediatamente después de autoclavar se enfrió en un baño de agua entre 45 - 50°C
- Asépticamente se vertió suficiente cantidad de medio de cultivo en cada placa de petri, para obtener una capa de 4 mm de espesor.
- Se dejó solidificar el medio de cultivo antes de usarlas para la inoculación.

4.6.2. Preparación del inóculo de *Staphylococcus aureus* (Ver Figura N°26)

- Del tubo con Caldo Infusión Cerebro Corazón inoculado con la cepa de *Staphylococcus aureus* en el procedimiento 3.4.4. tomar una asada.
- Inocular en una placa con Agar Tripticasa Soya (TSA).
- Incubar 35 ± 2 °C por 24 horas.
- Realizar el procedimiento para preparar el estándar de turbidez de la bacteria según el tubo N°5 de la escala de Mc Farland. Correspondiente a 1.0×10^6 UFC/ml de inóculo.

4.6.3. Preparación del estándar de turbidez

El estándar de turbidez se preparó de la siguiente manera:

- Se preparó una solución de Cloruro de Bario 1% (BaCl_2) y una solución de Ácido Sulfúrico 1% (H_2SO_4) para preparar el estándar de turbidez de la solución patrón.
- En un tubo de ensayo limpio y seco se agregó 9.5 ml de una solución de H_2SO_4 al 1%.
- Luego se añadió 0.5ml de una solución de BaCl_2 al 1%.
- Se agitó en el vortex.
- Para estandarizar la solución se leyó en el espectrofotómetro a 626 nm, haciendo diluciones con solución salina estéril.

4.6.4. Preparación de la suspensión del microorganismo (Ver Figura N°26)

- Colocar 10 ml de agua destilada estéril en los tubos con rosca.
- Con un asa tomar una colonia aislada del agar TSA.
- Comparar con el estándar de turbidez según el tubo N°5 de la escala de Mc Farland.

4.6.5. Inoculación de *Staphylococcus aureus* (Ver Figura N°27)

- Inocular la placa mediante un hisopo estéril utilizando una suspensión del microorganismo con una turbidez equivalente a 1.0×10^6 bacterias (Equivale al tubo No. 5 de la escala de Mc Farland).
- Sumergir un hisopo estéril en el cultivo y elimine el exceso rotándolo firmemente contra la pared interna del tubo.
- Frotar el hisopo sobre la superficie del medio de cultivo.
- Repetir esta operación por tres veces sucesivas, rotando la placa para obtener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie.
- Coloque la tapa a la placa y deje secar el inóculo por 3 a 5 minutos.
- Colocar los discos de los antibióticos: Oxitetraciclina, Tetraciclina y Penicilina G, sobre el agar utilizando pinzas estériles o usando un aplicador de discos.
- Oprima los discos suavemente con una pinza para asegurar un buen contacto con el medio de cultivo.
- Los discos deben estar espaciados de manera que su distancia a la pared de la placa sea de 15 mm y entre ellos de 30 mm.
- Incubar a 35 – 37°C aproximadamente de 18-19 horas.

4.6.6. Lectura de resultados

- La medida del diámetro de la zona de inhibición se hace preferentemente desde el exterior de la placa, sin quitar la tapa, midiendo con un pie de rey.
- Los resultados se interpretan de acuerdo con la tabla de la NCCLS. (Ver Anexo N°17)

4.7 Ensayo de control con cepa ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus* (Ver Anexo N°5)

- El ensayo de control se realizó con una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, cuya sensibilidad se conoce. La cepa control se analizó simultáneamente con la cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de las muestras de leche cruda de vaca. Según el procedimiento 3.4.5.
- Las zonas de inhibición obtenidas con ellos deben estar comprendidas entre los valores indicados en las tablas establecidas.

4.8 Determinación de restos de antibióticos en leche cruda de vaca por medio del kit SNAPduo Beta-Tetra ST Test (Ver Anexo N°6)

4.8.1. Procedimiento de la Prueba Ver Figura N°8

- Colocar el dispositivo SNAP sobre una superficie plana.
- Agitar muy bien la muestra de leche cruda de vaca.
- Quitar la tapa del tubo donde agregará la muestra.
- Usando la pipeta IDEXX, extraiga la muestra de leche ($450 \pm 50 \mu\text{l}$) hasta la línea indicadora.

NOTA: Al pipetear, sé toma la muestra del centro del recipiente de la muestra y se extrae lentamente la muestra hacia la pipeta para evitar las burbujas de aire.

- Agregue la totalidad de la muestra de leche de la pipeta al tubo de la muestra y, a continuación, tapar y agitar el tubo de la muestra para disolver la pastilla de reactivo.

NOTA: Evitar que la muestra permanezca en el tubo más de 15 segundos.

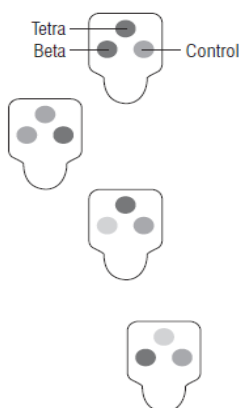
4.8.2. Agregado de la muestra al dispositivo SNAP

- Vierta el contenido del tubo de la muestra en el pocillo de muestras del dispositivo SNAP y deseche el tubo.
- La muestra fluye a través de la ventana de resultados hacia el círculo de activación azul.
- Una vez que la muestra haya ingresado al círculo de activación, pero antes de que desaparezca completamente el círculo azul, presione firmemente el botón activador hasta que quede al mismo nivel (horizontalmente) que el cuerpo del dispositivo SNAP.
- Después de la activación, espere 6 minutos e intérprete inmediatamente el resultado.

4.8.3. Interpretación de los Resultados de la Prueba

Lectura visual.

Se coloca el dispositivo SNAP con el pocillo de muestras hacia arriba. Si no se desarrolla color en el punto del control, se repite el análisis de la muestra.



- Resultado negativo tanto para Beta como para Tetra

Ambos puntos de la muestra son más oscuros o iguales al punto del control.

- Resultado positivo tanto para Beta como para Tetra

Ambos puntos de la muestra son más claros que el punto del control.

- Beta positivo, Tetra negativo

Si el punto de la muestra beta es más claro que el punto del control, entonces la muestra es positiva para beta - lactamos. Si el punto de la muestra tetra es más oscuro o igual al punto del control, entonces la muestra es negativa para tetraciclinas.

- Tetra positivo, Beta negativo

Si el punto de la muestra tetra es más claro que el punto del control, entonces la muestra es positiva para tetraciclinas. Si el punto de la muestra beta es más oscuro o igual al punto del control, entonces la muestra es negativa para beta - lactamos.

4.9 Proceso de pasteurización a nivel de laboratorio de leche cruda de vaca (Ver Anexo N°7)

4.9.1. Proceso de Baja Temperatura por Largo tiempo LTLT

- Se coloca la leche cruda de vaca en un Erlenmeyer dentro del baño maría
- Calentar la leche cruda de vaca a una temperatura entre 62 y 64 °C por un tiempo de 30 minutos.
- La leche se calienta a través del agua caliente que se encuentra en el baño maría y se da el intercambio de calor.
- Una vez calentada la leche se enfría a una temperatura menor a 10°C

4.10. Conteo y aislamiento de cepa de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche pasteurizada de vaca (Ver Anexo N°8)

4.10.1 Preparación de la muestra (Ver Figura N°32)

- Pipetear 25 ml de leche pasteurizada de vaca
- Transferir a un frasco de dilución conteniendo 225 ml de solución de Agua Peptonada Buferada (pH 7.2)
- Agitar por 5 minutos (Dilución 10-1)

4.10.2. Determinación de *Staphylococcus aureus* (Ver Figura N°32)

- Agitar la muestra fuertemente (Dilución 10-1)
- Pipetear en 3 placas de petri 0.3 ml, 0.3 ml y 0.4 ml de la muestra y colocarlo respectivamente en cada placa conteniendo Agar Baird Parker
- Esparcir con un asa en “L”
- Incubar las placas a 35 - 37°C por 24 - 48 horas
- Observar el desarrollo de colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* de aspecto negro brillante, con formación de halo alrededor de la colonia

4.10.3. Confirmación de colonias sospechosas (Ver Figura N°33)

- Seleccionar 5 colonias negras, redondas, brillantes y con halo del Agar Baird Parker
- Tomar con un asa
- Sembrar en un tubo con Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI).
- Incubar a 35 ± 2 °C por 24 horas
- Tomar 0.5 ml del Caldo Infusión Cerebro Corazón inoculado
- Sembrar en 0.5 ml de un tubo con plasma

- Incubar a 35 ± 2 °C por 24 horas
- Observar la formación de un coágulo, que no se deshace al invertir el tubo. Esto indica prueba positiva (+).

4.10.4. Cuento de colonias de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche pasteurizada de vaca

El recuento de colonias en placa se realizará de la siguiente manera:

Placas normales que contienen entre 25 - 250 colonias:

- Seleccionar las placas libres de crecimiento invasivo.
- Contar todas las colonias incluyendo aquellas de tamaño muy pequeño.
- Anotar por dilución, el número de colonias contadas en cada placa.

Casos especiales

- Si no se tienen placas que cumplan con el requisito anterior, proceder de la siguiente manera:

Placas sobrepobladas (más de 250 colonias):

- Anotar los recuentos de placas sobrepobladas como demasiado numerosos para contar (DNPC) cuando disponga de placas normales.
- Si no dispone de placas normales en las diluciones sembradas, contar las colonias en porciones de la placa si su distribución es homogénea y calcular el recuento estimado en placa (RPES).
- Si hay menos de 10 colonias por cm^2 , contar las colonias en 12 cuadrados, seleccionar 6 cuadrados consecutivos horizontales de la placa y 6 cuadrados consecutivos formando ángulo recto, contar cada cuadrado sólo una vez.
- Si hay más de 10 colonias por cm^2 contar las colonias en cuatro de tales

porciones.

- En ambos casos, multiplicar el número promedio de las colonias contadas por cm² por el área de la placa usada para estimar el número de colonias por placa. Cada laboratorio debe determinar el área en cm² de las placas usadas. Registre los valores obtenidos e indique como recuento estimado.
- Si hay más de 100 colonias por cm², registrar como >100 col / cm².

Placas con menos de 25 colonias (< 25 colonias)

- Cuando las placas de las diluciones tienen menos de 25 colonias cada una, registre los valores obtenidos e indique como recuento estimado.

Placas sin desarrollo de colonias

- Cuando ninguna de las placas presente desarrollo de colonias, registrar como sin desarrollo en la dilución correspondiente (SD) o < 1 por la correspondiente dilución más baja e indique como recuento estimado.

Para el recuento se utiliza la siguiente fórmula:

$$UFC/ml = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias en placa} \times 1 \times FD}{Volumen \text{ del inóculo}}$$

En donde:

UFC: Unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra

Volumen del inóculo: cantidad de muestra inculada en la placa en mililitros

Número de colonias en la placa: colonias características presentes en la placa, después del tiempo de incubación.

FD: Factor de dilución

Comparar los resultados con los criterios establecidos en el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08. (Ver anexo N°15).

CAPITULO V
RESULTADOS

5.0. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

El muestreo se realizó en una lechería ubicada en el municipio de El Porvenir departamento de Santa Ana. (Ver Anexo N°9). A través de una lista de chequeo se verificaron las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA).

Las muestras se obtuvieron de 15 vacas, por cada vaca se obtuvo un total de 4 muestras, una por teta, haciendo un total de 60 muestras. Las cuales fueron analizadas en el Laboratorio de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

5.1. Lista de chequeo para la verificación de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) de la lechería (Ver Anexo 1)

La lista de chequeo consta de dos partes cada una de ellas está estructurada de manera diferente. Ambas partes de la lista de chequeo tienen como finalidad investigar las condiciones higiénicas de la lechería en estudio, los resultados se presentan a continuación:

PARTE I (Lista de chequeo)

La parte I consta de preguntas directas que se le realizaron al encargado del ordeño y cuidado de las vacas. Las respuestas se presentan a continuación:

1. ¿Qué tipo de ordeño realizan en la lechería?

En la lechería se realizan dos tipos de ordeño:

- a) Ordeño manual: se ordeñan de esta forma a las vacas enfermas o que se están bajo tratamiento farmacológico. (Ver Figura N°36)
- b) Ordeño automatizado: se práctica este tipo de ordeño a las vacas sanas. (Ver Figura N°37 y N°38)

Durante el proceso de ordeño se detectó que de las 60 vacas que se ordeñan 15 estaban enfermas y se ordeñan de forma manual y las 45 vacas restantes están sanas y se ordeñan de forma automatizada. Los resultados se pueden observar en la Tabla N° 1

Tabla N° 1 Resultado del tipo de ordeño realizado

Tipo de ordeño	Porcentaje
Manual	25%
Automatizado	75%

Se realizan dos tipos de ordeño ya que la leche de las vacas enfermas no puede estar en contacto con la leche de las vacas sanas, porque la calidad de la leche en las vacas enfermas es baja y podría ocasionar enfermedades a los consumidores. Los resultados en porcentaje se encuentran en la Figura N°1.

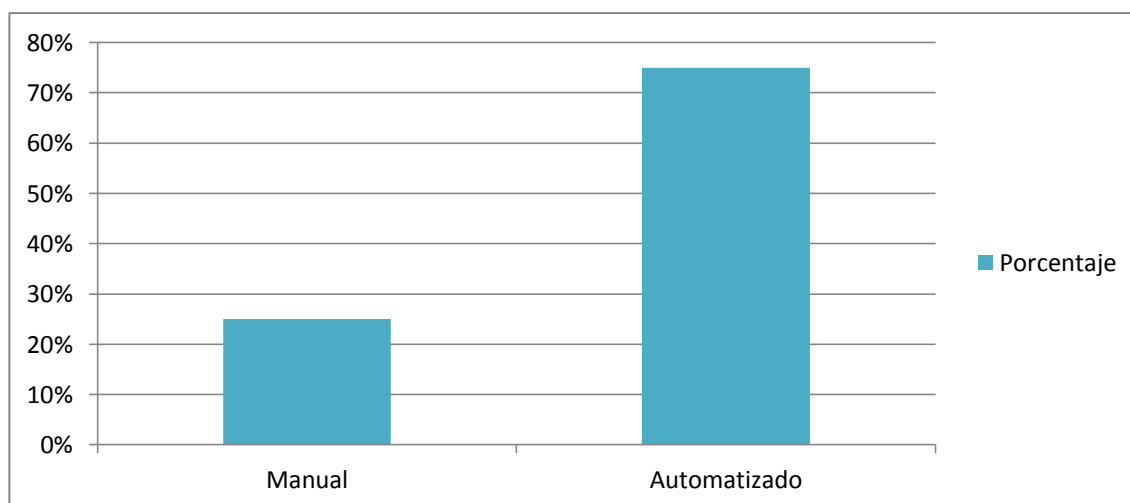


Figura N°1 Gráfica de tipo de ordeño que se práctica en la lechería

El 25% de las vacas se ordeñan de forma manual cuando están enfermas o están siendo tratadas con medicamentos. El 75% de las vacas se ordeñan de manera automatizada, estas vacas se encuentran sanas.

2. ¿Qué materiales se utilizan en el ordeño?

En la lechería se utilizan dos tipos de ordeño por lo tanto para el desarrollo de cada uno de ellos, van a variar los utensilios y equipos a utilizar. En ambos tipos de ordeño se corre el riesgo de contaminación. El listado de materiales utilizados se expresa en la Tabla N°2.

Tabla N°2 Materiales utilizados en el ordeño

Listado de materiales	
Tipo de ordeño	
Manual	Automatizado
Baldes de plástico	Pezoneras
Paste	Extractor con bomba de vacío
Tanque almacenador de leche	Tanque almacenador de leche
Fanelas	Fanelas

Durante el ordeño manual juega un papel muy importante la persona encargada del ordeño ya que puede ser fuente principal de contaminación. Además el mismo animal puede contaminar la leche, por medio de las células epiteliales de la ubre. El aseo de los utensilios debe ser muy estricto y cuidadoso para evitar que sean fuente directa de contaminación.

El ordeño automatizado es una de las técnicas más utilizadas en las lecherías que tienen gran demanda de leche debido a que la comercializan a la industria láctea. Para hacer sus procesos más productivos y rápidos utilizan este método para ello deben tener extremo cuidado y limpieza del sistema de ordeño, ya que este es cerrado y se utiliza a diario.

3. ¿Qué tipo de estabulación tienen el ganado?

El tipo de estabulación para todas las vacas es de tipo semi cerrado esto quiere decir que tienen una parte cerrada en la que se encuentra la comida y el agua y otra parte que es abierta, para que tenga contacto con la luz y el aire. Tabla N°3

Tabla N°3 Tipo de estabulación

Tipo de estabulación
Semi cerrada

Las condiciones de estabulación van a variar de acuerdo al clima y el lugar. Este establo esta adecuado a las condiciones naturales de la zona y del hábitat de las vacas. Ver Anexo N°1.

4. ¿Se impide el estancamiento de leche en la ubre de la vaca después del ordeño?

La retención de leche en las tetas de la vaca después del ordeño se debe evitar debido a que la leche retenida es medio para el crecimiento de microorganismos y esto provoca enfermedades como la mastitis y por ende un déficit de la calidad de la leche. La respuesta se observa en la Tabla N°4.

Tabla N° 4 Estancamiento de la leche

Estancamiento de leche	Respuesta
Si	100%
No	0%

Se verificó que el total de las 60 vacas ordeñadas no tuviera residuos de leche después de la realización del ordeño.

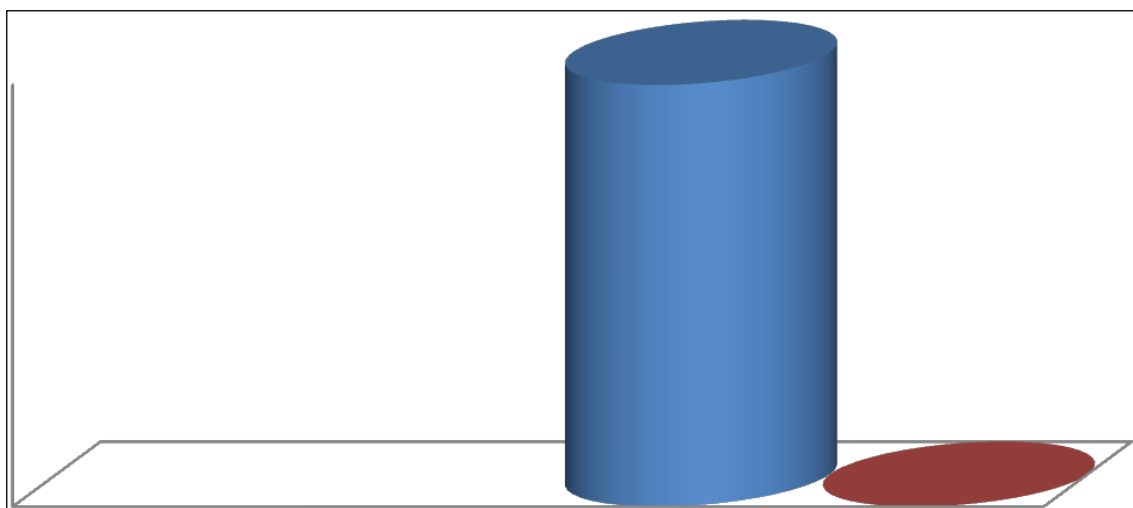


Figura N°2 Estancamiento de leche en las tetas de la vaca

En el 100% de las vacas ordeñadas se evita la retención de leche en las tetas. Durante el ordeño, ya sea manual o automatizado, se evita que quede leche retenida en las tetas de la ubre de la vaca.

5. ¿Con qué frecuencia se realiza el ordeño en la lechería?

El ordeño se realiza todos los días, de lunes a domingo. La frecuencia diaria de ordeño es dos veces al día, una por la mañana de 4 a.m. a 6 a.m. y por la tarde

de 2 p.m. a 4 p.m.

Las vacas que se someten a ordeño con esta frecuencia son todas las vacas sanas de la lechería. Los resultados están reflejados en la Figura N°3

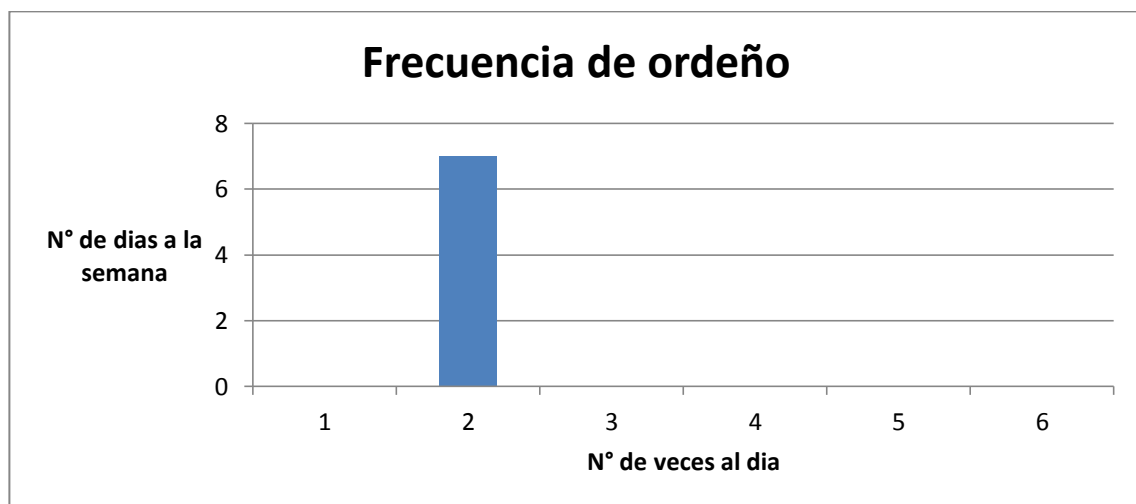


Figura N°3 Frecuencia de ordeño

6. ¿El ganado está en constante control por parte de un médico veterinario?

Todas las vacas reciben control veterinario una vez al mes. Durante este control se les realiza un chequeo general. El control veterinario se asocia con el uso correcto de los medicamentos para el tratamiento de enfermedades del ganado. En este caso el tratamiento de mastitis con antibióticos. Los riesgos potenciales de que el ganado no reciba atención veterinaria es uso incorrecto de medicamentos en el tratamiento de vacas lecheras ya que puede dar como resultado la contaminación de la leche con niveles de residuos de antibióticos, que la harán no apta para el consumo humano. El resultado se refleja en la Figura N°4

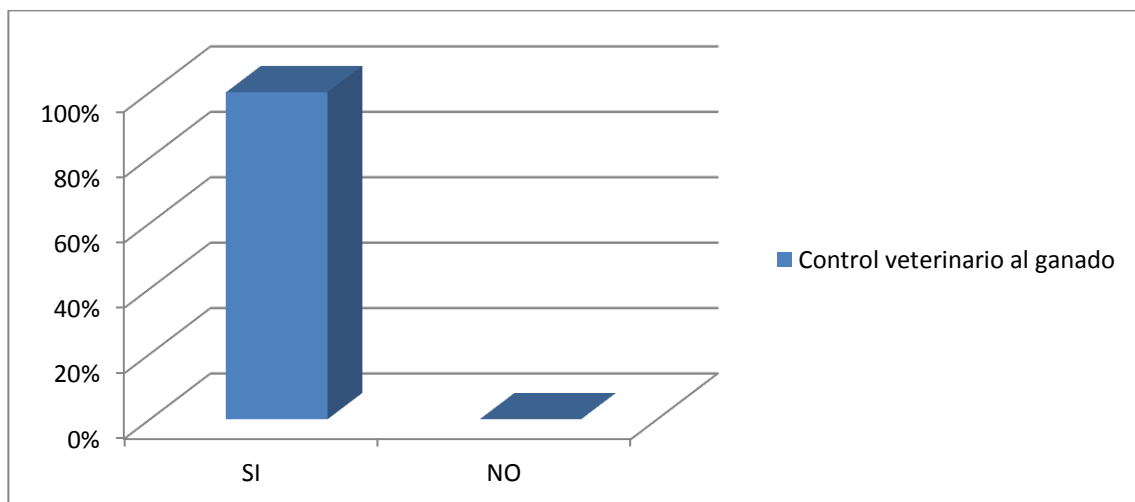


Figura N°4 Control veterinario de las vacas

7. ¿Cuáles es el porcentaje de enfermedades que padece el ganado?

En la lechería se lleva un registro de enfermedades de cada vaca, estos datos se obtuvieron, entrevistando al encargado del cuidado de las vacas en la lechería, los resultados se reflejan en la Tabla N° 5.

Tabla N°5 Enfermedades más frecuentes que afectan a las vacas

Enfermedades	Porcentaje	N° de vacas afectadas
Mastitis	9.0%	15
Fiebre de leche	3.0%	5
Tos	1.2%	2
Vómito	0.6%	1
TOTAL DE VACAS ENFERMAS		23

Las enfermedades más comunes se expresan a continuación en porcentajes en la Figura N°5

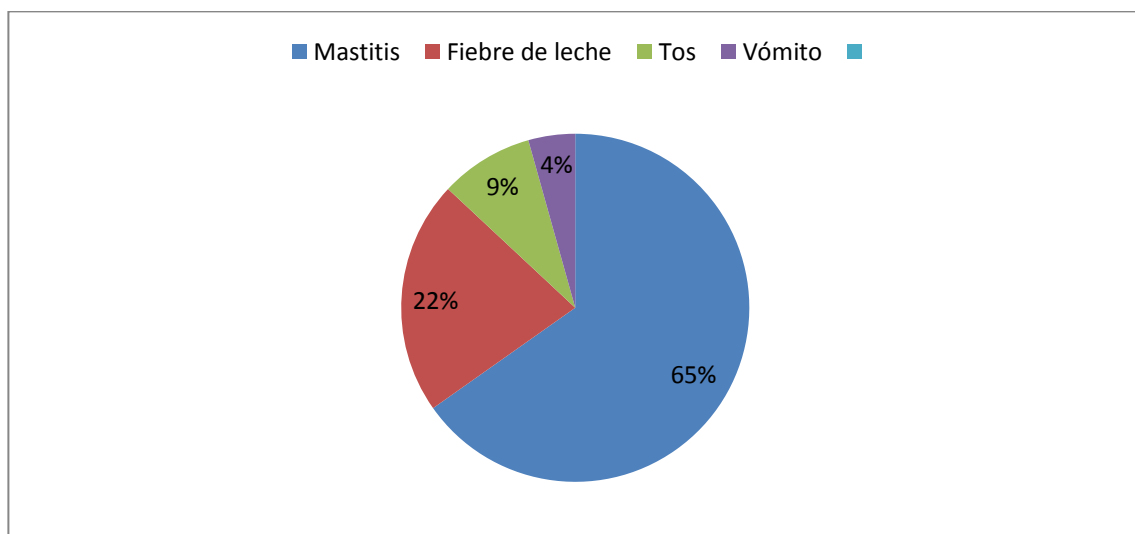


Figura N°5 Resultado de las enfermedades que afectan a las vacas

Las enfermedades más comunes son:

- Mastitis 65%

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria, producida por infección. Esto afecta en gran medida a la producción porque a causa de la infección la calidad de la leche disminuye y la hace no apta para el consumo humano.

- Fiebre de Leche 22%

La Fiebre de Leche o Paresia Puerperal es una enfermedad metabólica común en el ganado vacuno, especialmente en las productoras de leche. Se presenta regularmente 24 horas antes del parto y hasta tres días post parto, y está causada por la incapacidad de equilibrar la demanda de calcio por la producción de leche, caracterizándose por, debilidad, postración y en casos severos shock y muerte del animal.

– Tos 9%

La tos en la vaca es un síntoma, de catarro, por el frío, o una lesión de garganta, o incluso puede llegar a ser un problema de pulmón. Ante la presencia de ese síntoma que observa el ganadero la vaca puede tener algo en el sistema respiratorio bien sea en la garganta, en la tráquea o en los bronquios.

– Vómito 4%

La vaca no suele vomitar, pero cuando lo hace, si no se trata con urgencia, puede causarle la muerte. El vomito es un síntoma raro y peligroso. Las causas por lo general suelen ser las obstrucciones del esófago. El vómito, lo expulsan por la boca con esfuerzo en cantidades grandes de alimentos y rumen de la panza, que es cuando tienen una sobrecarga alimenticia.

8. ¿Cuál es el tratamiento que se utiliza para tratar a las vacas enfermas de mastitis?

El encargado del cuidado y ordeño de las vacas es quien suministra los antibióticos a las vacas, en ausencia del médico veterinario es quien elige el tratamiento farmacológico para las enfermedades. Los medicamentos y los nombres del principal principio activo se reflejan en la Tabla N°6.

Tabla N°6 Medicamentos usados en la lechería para tratar la mastitis en vacas.

Nombre del medicamento	Principios activos
Mastijet Forte	Tetraciclina
Mastilab Lactancia	Oxitetraciclina
Estreptopen	Penicilina G

La prevención de la aparición de residuos de antibióticos en la leche cruda de vaca exige un manejo prudente de medicamentos veterinarios por parte del ganadero, médico veterinario y el encargado del cuidado del ganado. Los antibióticos más utilizados se reflejan en la Figura N°36.

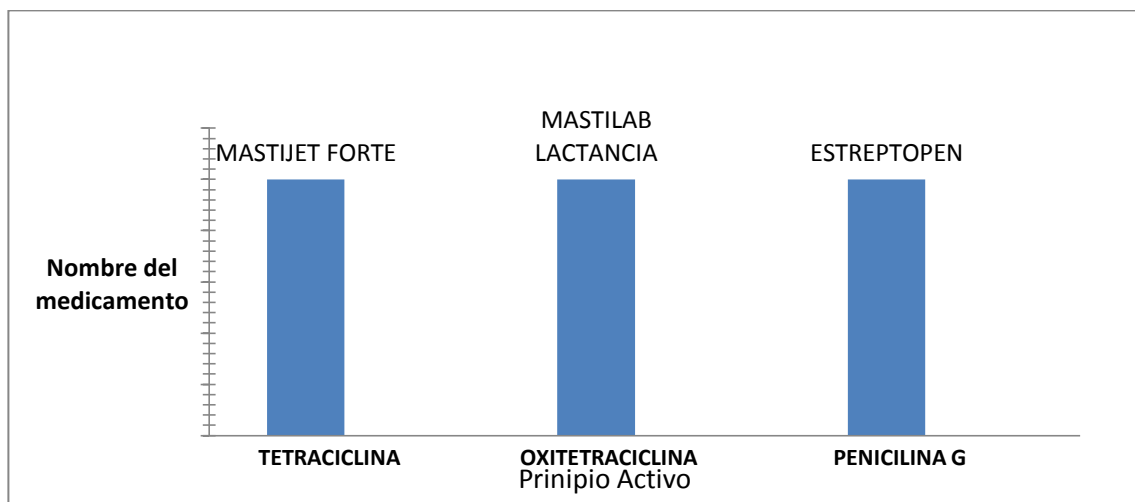


Figura N°6 Medicamentos usados en la lechería para tratar la mastitis en vacas

Los antibióticos que se utilizan son de venta popular y se encuentran en los agrosericios cercanos al lugar en el que está ubicado la lechería. Los productos comerciales utilizados son:

- Mastijet Forte

Es una suspensión intramamaria altamente sinérgica de amplio espectro, su principio activo principal es la Tetraciclina, para el tratamiento de mastitis en lactancia. Se utiliza para el tratamiento de mastitis bovina sensibles a la asociación de antibióticos incluyendo casos graves de coliformes y *Staphylococcus aureus*. Ver Figura N°40

- Mastilab Lactancia

Es una potente suspensión antibiótica intramamaria, de amplio espectro de acción, por el sinergismo de sus componentes, entre ellos el principio activo principal es la Oxitetraciclina. Está indicada en el tratamiento de mastitis en vacas lactantes, causada por microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*. Figura N°41

– Estreptopen

Es una solución inyectable aplicada por vía intramuscular, utiliza para el tratamiento de la mastitis por su combinación penicilina-estreptomicina, como activo principal contiene Penicilina G. Figura N°42

9. ¿Cuáles son las condiciones de almacenamiento de la leche después del ordeño?

Las condiciones de almacenamiento de la leche luego del ordeño se reflejan en la Tabla N°7.

Tabla N°7 Condiciones de almacenamiento de la leche

Condiciones de almacenamiento de la leche ordeñada	
Parámetro	Condiciones
Tiempo	24 horas
Temperatura	2°C - 4°C
Capacidad del contenedor	1,540 botellas
Ubicación del contenedor	Cuarto anexo al área de ordeño

La leche ordeñada no se transporta el mismo día hacia el lugar a donde se comercializa, por lo tanto debe de tener las condiciones aptas para que su almacenamiento no interfiera con las propiedades organolépticas. Estas condiciones son muy importantes ya que el transporte que recoge la leche solo llega 3 veces por semana. Ver Figura N°43.

10. ¿Se realizan pruebas microbiológicas a la leche ordeñada?

La leche cruda de vaca obtenida de la lechería, es sometida a pruebas microbiológicas. Estas pruebas se realizan por parte de la empresa que compra la leche, en la lechería no se le hace ningún tipo de prueba microbiológica.

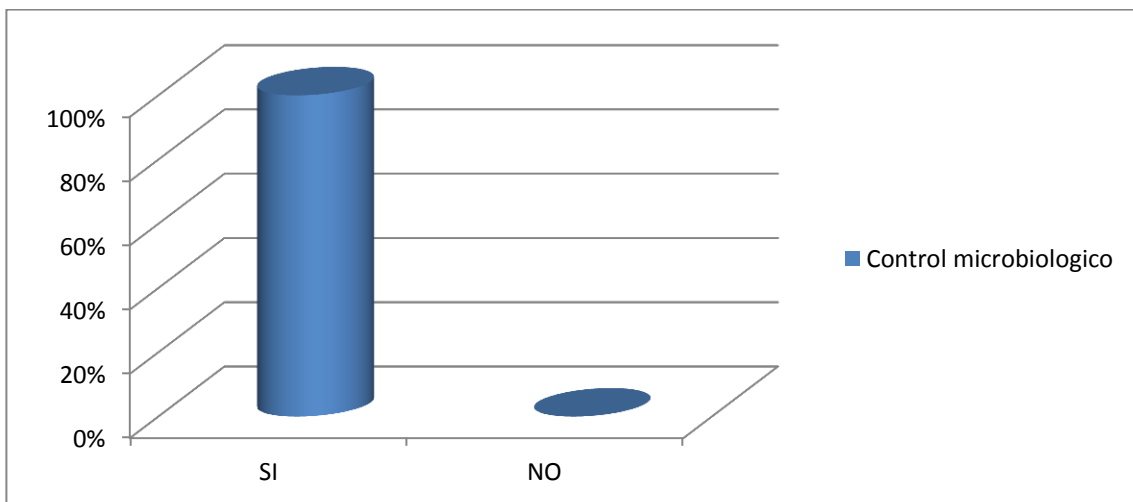


Figura N°7 Control microbiológico de la leche cruda de vaca

Según la Figura N°7 el 100% de la leche que se comercializa es sometida a pruebas microbiológicas.

11. Mencione el nombre de las pruebas de calidad que se le realizan a la leche cruda, además de las pruebas microbiológicas. Es importante que la leche que se comercializa cumpla con estándares de calidad. Por esa razón la empresa que compra la leche para su uso en la industria, le realiza pruebas que indican que la leche esta apta para el consumo humano y la elaboración de productos derivados de la leche. Las pruebas que le hacen se detallan en la Tabla N°8.

Tabla N° 8 Pruebas que se realizan a la leche cruda de vaca

Prueba
Olor
Acidéz
Reductasa
Crioscópica
Residuos de antibióticos

Los resultados y el dictamen de aprobación son enviados a la lechería para que ellos los tomen en cuenta para la mejora continua en sus procesos y cuidado del ganado. Estas pruebas se realizan a toda la leche cruda para que pueda ser utilizada en la industria.

12. ¿Durante que etapa y porque motivos se puede interrumpir el ordeño de las vacas?

El ordeño se interrumpe cuando las vacas están enfermas o están bajo tratamiento farmacológico.

Se registraron 20 vacas con enfermedades como: mastitis, fiebre de leche y vomito de ellas, 10 recibieron tratamiento farmacológico. De estas 20 vacas solo se les suspendió el ordeño a 14 y las restantes 6 estaban siendo ordeñadas de manera rutinaria.

Tabla N° 9 Porcentaje de vacas y motivos por los cuales se les suspende el ordeño

Motivo	Porcentaje
Tratamiento con antibióticos active	90%
Enfermas por mastitis	40%
Otras Enfermedades	70%

Existen muchos casos durante los cuales se suspende el ordeño de las vacas, regularmente el ordeño se suspende debido a que las vacas están enfermas o cuando están siendo tratadas con antibióticos. Figura N°8.

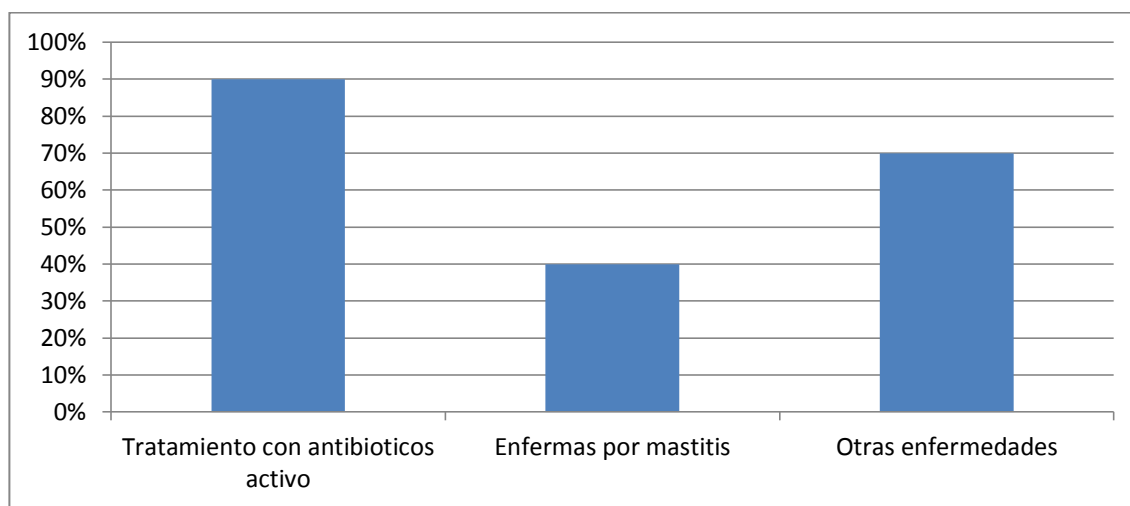


Figura N°8 Porcentaje de vacas a las que se les suspende el ordeño

En un 90% se suspende el ordeño cuando las vacas están siendo tratadas con antibióticos, en un 40% cuando están enfermas de mastitis y no están

recibiendo un tratamiento con antibióticos y debido a otras enfermedades el ordeño se suspende en un 70% de las vacas afectadas. Esto es un indicador de que un porcentaje de vacas que se encuentran enfermas o tratadas con antibióticos están siendo ordeñadas.

Lo ideal sería que en cualquiera de estos casos el porcentaje de suspensión del ordeño sea el 100%.

PARTE II (Lista de chequeo)

Consta de cinco secciones, cada una de ellas contiene criterios bajo los cuales se pueden determinar el cumplimiento de las condiciones higiénicas de la lechería, durante sus procesos de ordeño.

Las secciones son las siguientes:

- a) Personal
- b) Alrededores
- c) Operaciones sanitarias
- d) Equipo y utensilios
- e) Producción y control de procesos

La lista de chequeo se respondió tomando en cuenta una sola respuesta con el criterio de selección entre SI o No, luego se sumaron las respuestas positivas dividiéndolas entre el número de ítems de la sección y se hizo el mismo procedimiento con las respuestas negativas; para obtener ambos porcentajes y determinar si cumple o no cumple con los criterios de la sección.

a) Personal

Durante el ordeño se verificaron las condiciones es las que el personal de la

lechería, realiza sus funciones; para determinar si cumplen o no con los requerimientos de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Las respuestas se observan en el Cuadro N°3.

Cuadro N°3 Criterios de selección para condiciones higiénicas del personal

CRITERIO	RESPUESTA	
	SI	NO
Uso correcto de mascarilla, redcilla de pelo, botas y un adecuado vestuario de trabajo		x
Cabello, barba y uñas recortadas		x
Se realiza un lavado de manos antes de comenzar el trabajo, después de cada ausencia del lugar de trabajo y cada vez que sea necesario	x	
El personal de la planta no porta joyas, relojes u otros objetos personales que puedan caer en el producto		x
Mantenimiento y uso de guantes asépticos al momento de manipular directamente el alimento		x

Según la respuesta a los criterios se calcularon los porcentajes de cumplimiento y NO cumplimiento. Estos porcentajes se tabularon y están reflejados en la Tabla N°10.

Tabla N°10 Porcentaje de cumplimiento de criterios del personal

Criterios	Porcentaje
SI	20%
NO	80%

Los cálculos para obtener los porcentajes se realizaron de la siguiente manera:

Cálculos para establecer el porcentaje de cumplimiento de criterios de la lista de chequeo.

$$\% \text{ de cumplimiento} = \frac{\Sigma \text{ de criterios con la respuesta SI}}{\Sigma \text{ del total de criterios}} \times 100$$

Por ejemplo:

$$\% \text{ de cumplimiento} = \frac{1}{5} \times 100$$

$$\% \text{ de cumplimiento} = 20 \%$$

El personal lava sus manos antes de comenzar el ordeño y cada vez que sea necesario cumpliendo con esto en un 20% los criterios de buenas prácticas de higiene en el proceso de ordeño. Y por otra parte no se cumplen puntos críticos como: utilizar la indumentaria adecuada (redcilla de pelo, botas, guantes y vestuario adecuado) y el uso de joyas.

Los porcentajes obtenidos se graficaron y se reflejan en la Figura N°39.

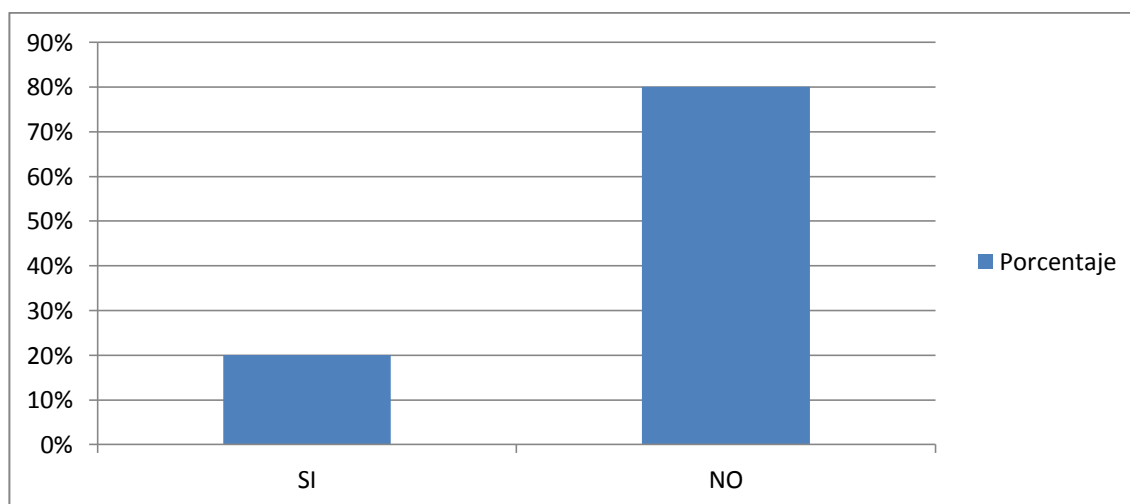


Figura N°9 Porcentaje de cumplimiento de criterios en la sección de personal

Los resultados indican que en un 80% el personal no cumple las prácticas de higiene dentro de la lechería. El personal es de las principales fuentes de contaminación del producto, cuando el personal no cumple con las medidas higiénicas necesarias la probabilidad de contaminación aumenta. Además de el riesgo a la salud que corre el personal cuando no hace uso de la indumentaria correcta, durante el ordeño.

b) Alrededores

Los alrededores son el hábitat del ganado y el lugar en donde viven y se desarrollan. Los criterios para evaluar esta sección están en el Cuadro N°4.

Cuadro N°4 Criterios de selección para condiciones higiénicas de alrededores

CRITERIO	RESPUESTA	
	SI	NO
Malezas debidamente podadas	x	
Depósitos de basura limpios y tapados	x	
Ausencia de acumulación de agua		x

En la Tabla N°11 se muestran los porcentajes de cumplimiento de los criterios evaluados.

Tabla N° 11 Porcentaje de cumplimiento de criterios para los alrededores.

Criterios	Porcentaje
SI	66.66%
NO	33.33%

El 66.66% de los criterios de esta sección se cumplen, siendo estos un indicador de la higiene de las condiciones higiénicas, ya que dentro de la lechería existen botes de basura bien tapados y áreas libres de maleza.

El 33.33% de los criterios se cumplen, este es un parámetro importante para evidenciar que aún hay aspectos relacionados con los alrededores de la lechería que se pueden mejorar. Como por ejemplo: cuidar que no haya acumulación de agua que ocasione la presencia de mosquitos, zancudos y microorganismos capaces de causar enfermedades a las vacas. Los resultados se refleja en la Figura N°10.

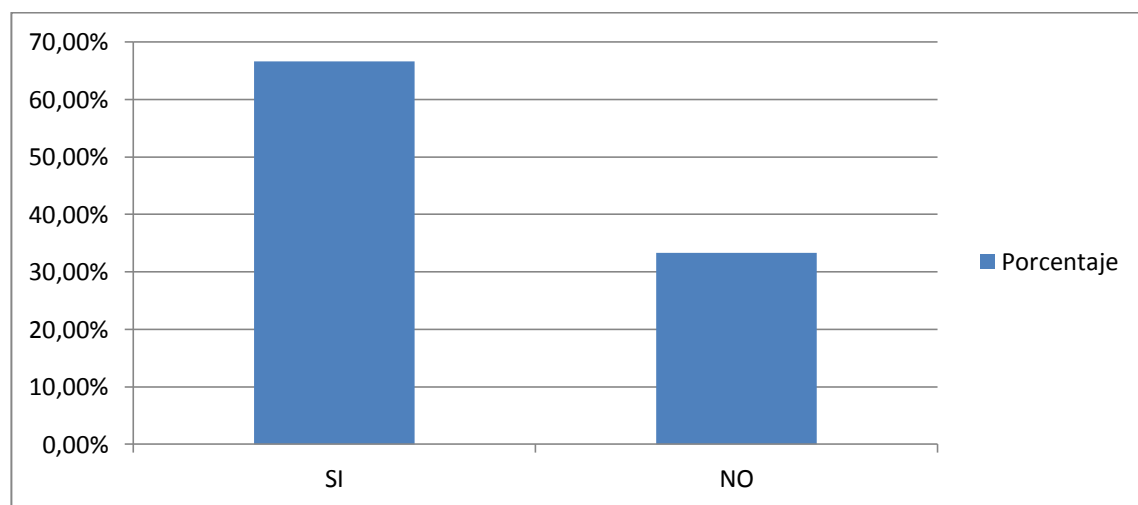


Figura N° 10 Porcentaje de cumplimiento de criterios para los alrededores.

En este caso la lechería cumple con alrededores libres de maleza, depósitos de basura limpios y tapados. Es importante que se conserven las condiciones higiénicas, esto influye en la salud de las vacas lecheras.

Debe mejorarse en aspectos como la acumulación de agua ya que esto genera lodo que se mezcla con el estiércol de las vacas siendo un riesgo potencial a infecciones en las vacas y en el personal. Y fuente de contaminación para la leche.

c) Operaciones sanitarias

Durante el proceso de ordeño es importante tener en cuenta que las instalaciones, equipos y materiales deben manipularse adecuadamente para su limpieza y conservación en buen estado. En el Cuadro N°5 se muestran los criterios evaluados para determinar si en los procesos se cumplen las condiciones higiénicas necesarias para que las operaciones realizadas no sean motivo de contaminación del producto.

Cuadro N°5 Criterios de selección para condiciones higiénicas de operaciones sanitarias

CRITERIO	RESPUESTA	
	SI	NO
Las paredes, pisos y ventanas, están en buen estado		x
Los materiales tóxicos de limpieza y desinfección están debidamente almacenados y rotulados	x	
Ausencia plagas, roedores y animales domésticos dentro de la lechería		x
Los equipos y utensilios son higienizados antes de comenzar con las labores de ordeño		x
El agua utilizada en el proceso, lavado y recirculación del equipo de ordeño, es potable y limpia		x
Servicios sanitarios funcionales, en buen estado y bien provistos		x
Estación de lavado de manos provista de insumos		x
Recipientes para basura bien tapados	x	
Las mangueras debidamente colocadas en su sujetador	x	

De acuerdo a la respuesta obtenida los porcentajes de cumplimiento y NO cumplimiento se expresan en la Tabla N°12.

Tabla N° 12 Porcentaje de cumplimiento de criterios de operaciones sanitarias.

Criterios	Porcentaje
SI	33.33%
NO	66.66%

Los porcentajes se graficaron y se encuentran en la Figura N°11.

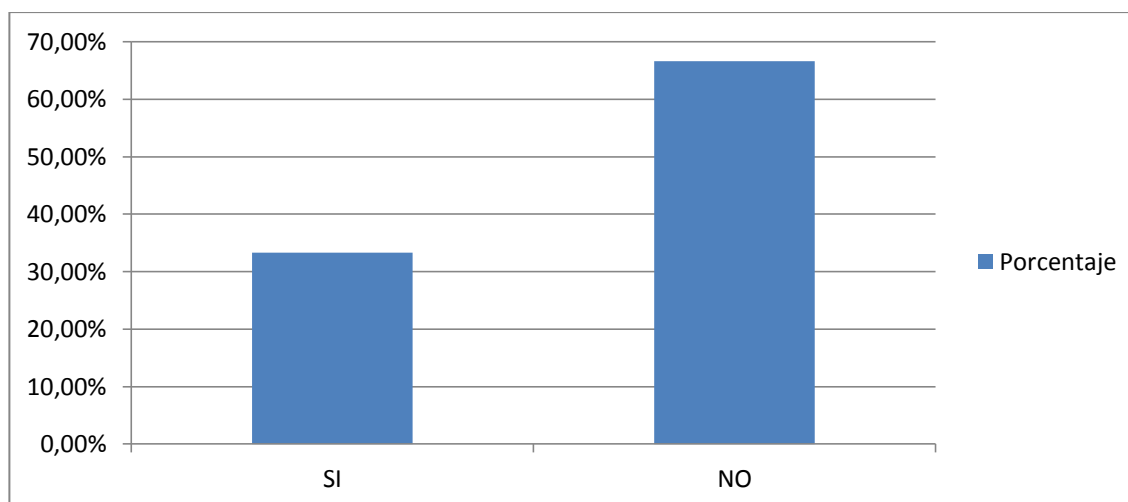


Figura N°11 Porcentaje de cumplimiento de criterios de operaciones sanitarias.

El 66.66% de los criterios evaluados no cumplen con respecto a las condiciones higiénicas, en los procesos que se llevan a cabo en la lechería.

Las paredes, ventanas, sanitarios y estación de lavado están deterioradas y los pisos no se lavan antes del proceso de ordeño. Este problema se da también con los utensilios y equipos ya que estos no son higienizados antes de utilizarlos.

Se observaron animales ajenos a la lechería, como pollos, gatos y perros los cuales no tienen que vivir dentro de las instalaciones exclusivas para el ganado. El agua potable utilizada para los procesos de lavado de utensilios y equipo es potable pero no tiene recirculación y estaba contaminada con suciedad del

ambiente.

Es de vital importancia para la protección del producto final y salud de las vacas, realizar los procesos de higienización y mantenimiento de instalaciones y equipo dentro de la lechería.

El 33.33% de los criterios fueron aspectos favorables en los que la lechería si está cumpliendo en cuanto a orden en las máquinas de ordeño, y en el manejo de desechos sólidos, debido a que poseen basureros bien tapados y en los cuales se recolecta la basura además cumplen con la correcta y adecuada identificación de materiales tóxicos usados para la limpieza de las áreas.

d) Equipo y Utensilios

Los criterios tomados en cuenta durante la evaluación de esta sección, se encuentran en el Cuadro N°4.

Cuadro N°6 Criterios de selección para condiciones higiénicas de equipo y utensilios.

CRITERIO	RESPUESTA	
	SI	NO
Todos los equipos están en buenas condiciones	x	
Utensilios en su respectivo lugar y que no se encuentran tirados en el piso	x	

Durante la visita a la lechería se observó el estado y el tratamiento de limpieza que reciben los equipos y utensilios. Según el resultado se pudo obtener el porcentaje de cumplimiento y No cumplimiento de los criterios evaluados. Esto se refleja en la Tabla N°13.

Tabla N°13 Porcentaje de cumplimiento de criterios para los equipos y utensilios

Criterios	Porcentaje
SI	100.00%
NO	0.00%

El 100% de los criterios fueron respuestas negativas. Se graficaron los valores y se observan en la Figura N°12.

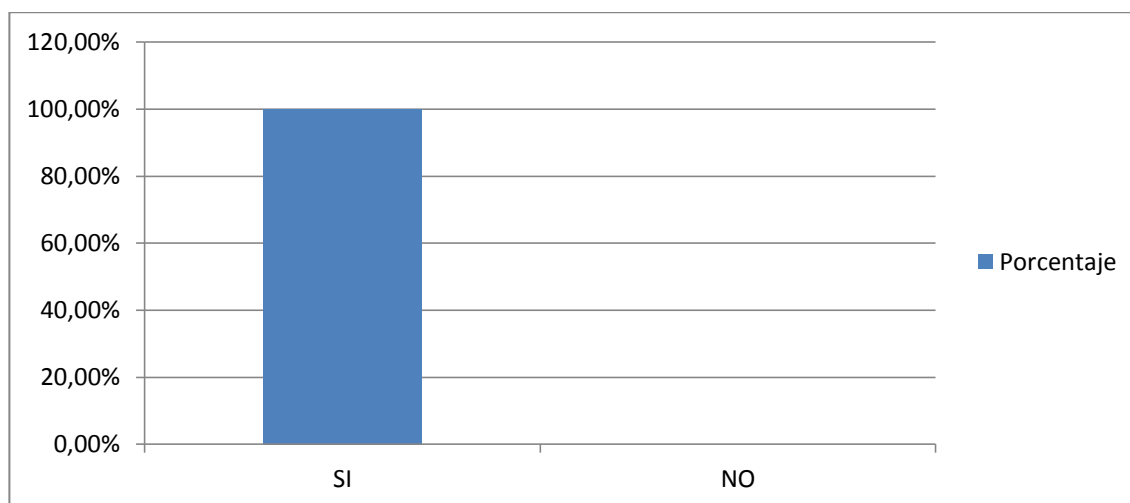


Figura N°12 Porcentaje de cumplimiento de criterios para el equipo y utensilios

Esta sección es un punto importante y crítico para la calidad de la leche, ya que los equipos y utensilios están en contacto directo con la leche ordeñada, y en gran medida la integridad microbiológica depende de la higiene de los equipos y utensilios utilizados durante el proceso de ordeño.

Los equipos se encuentran en buen estado y condiciones aceptables para ser utilizados.

e) Producción y control de procesos

Durante la visita a la lechería se pudo verificar el proceso de ordeño y los procesos que lo componen, para evaluar se respondieron a los criterios reflejados en el Cuadro N°7 el cual contiene las respuestas de la evaluación realizada.

Cuadro N°7 Criterios de selección para condiciones higiénicas de control de procesos

CRITERIO	RESPUESTA	
	SI	NO
Registros de análisis microbiológicos de la leche		x
Material de envase desinfectado antes de utilizarlo		x
Almacenamiento y transporte de producto terminado se realiza de manera que se evite la contaminación	x	

Según los criterios de selección se tabularon los porcentajes de cumplimiento y el de No cumplimiento. Se muestran en la Tabla N°14

Tabla N°14 Porcentaje de cumplimiento de criterios para la producción y control de procesos

Criterios	Porcentaje
SI	33.33%
NO	66.66%

El 33.33% de las respuestas fueron positivas y el 66.66% de la totalidad de ítems fueron respuestas negativas. Los datos se muestran graficados en la Figura N°43.

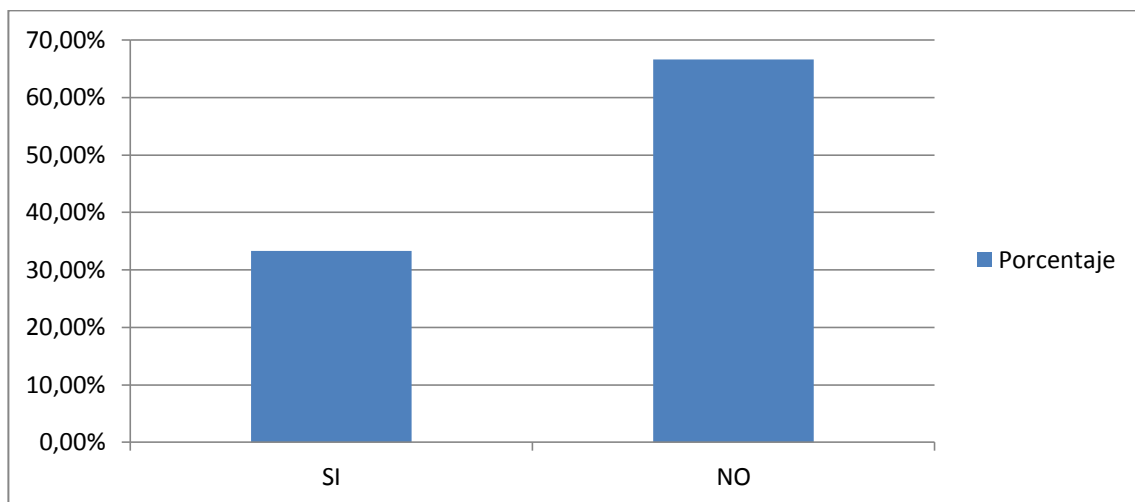


Figura N°13 Porcentaje de cumplimiento de criterios para la producción y control de procesos

La producción y control de procesos no cumplen con los criterios de condiciones higiénicas. Dentro de la lechería no existen registros microbiológicos que respalden los procesos, además que los materiales y utensilios no se desinfectan antes de usarlos. Estas malas prácticas son un factor importante de contaminación cruzada entre utensilios y la leche ordeñada. El almacenamiento que se le da al producto terminado cumple con las especificaciones de calidad para evitar el crecimiento de microorganismos y el transporte de la leche cruda se realiza en un camión con tanque de refrigeración para cuidar la cadena de frío.

5.2. Aislamiento y cuantificación de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche pasteurizada para comparar si cumple con el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08.

La leche cruda de vaca se pasteurizó a nivel de laboratorio según el procedimiento del Anexo N°14.

Las muestras de leche cruda se agregaron a un Erlenmeyer de 1000 ml luego se procedió a la pasteurización. Figura N°44 y 45.

Para el análisis se tomaron sub muestras que constituyen fracciones aproximadamente de 50 ml de leche pasteurizada.

A partir de las muestras se aisló y cuantificó *Staphylococcus aureus* usando Agar diferencial, en este caso Agar Baird Parker, en el cual se observó el crecimiento de colonias negras, brillantes con halo característico. (Ver Figura N°46 y 47)

Luego se procedió al conteo de las colonias aisladas y el resultado obtenido se comparó con los límites microbiológicos de *Staphylococcus aureus* establecidos en el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08. (Ver Figura N°53)

En esta determinación se realizaron dos ensayos, los cuales se discuten a continuación:

ENSAYO I

Durante este ensayo se pasteurizaron 1000 ml de leche cruda de vaca y se separaron en frascos 20 frascos fracciones individuales de 50 ml para proceder al aislamiento y conteo de *Staphylococcus aureus*.

Los resultados del conteo de colonias y el número de UFC/ml por cada de sub muestras analizada se reflejan en la Tabla N°15.

Tabla N°15 Resultado para el conteo de colonias para leche pasteurizada.

Número de fracción	Dilución 10 ⁻¹			Resultados
	Volumen del inóculo			Límite Máximo permitido de <i>Staphylococcus aureus</i> 10 ² UFC/ml
	0.3	0.3	0.4	UFC/ml
1	0	0	0	<10 UFC/ml
2	0	0	0	<10 UFC/ml
3	0	0	0	<10 UFC/ml
4	0	0	0	<10 UFC/ml
5	0	0	0	<10 UFC/ml
6	0	0	0	<10 UFC/ml
7	0	0	0	<10 UFC/ml
8	0	0	0	<10 UFC/ml
9	0	0	0	<10 UFC/ml
10	0	1	0	33.33 UFC/ml
11	0	0	0	<10 UFC/ml
12	0	0	0	<10 UFC/ml
13	0	0	0	<10 UFC/ml
14	0	0	0	<10 UFC/ml
15	0	0	0	<10 UFC/ml
16	0	0	0	<10 UFC/ml
17	0	0	0	<10 UFC/ml
18	0	0	0	<10 UFC/ml
19	0	0	0	<10 UFC/ml
20	0	0	0	<10 UFC/ml

Para obtener el número de UFC/ml y comparar con los límites microbiológicos establecidos en el RTCA se hace uso de la siguiente fórmula:

$$UFC/ml = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias en placa} \times 1 \times FD}{\text{Volumen del inóculo}}$$

En donde:

Factor de dilución (FD): Es el inverso de la dilución

Número de colonias: Conteo de colonias por cada volumen de inóculo

Volumen del inóculo: Volumen de muestra inoculado en cada placa.

El cálculo para el número de UFC/ml del Ensayo I se realizó haciendo uso de la fórmula, como se indica a continuación:

$$UFC/ml = \frac{1 \times 1 \times 10}{0.3 \text{ ml}}$$

$$UFC/ml = 33.33$$

El límite microbiológico para *Staphylococcus aureus* en leche pasteurizada, según el RTCA es de 102 UFC/ml. Durante el primer ensayo se verificó que ninguna muestra se sale de la especificación de límites microbiológicos, por lo tanto si cumple con la normativa.

ENSAYO II

La leche cruda de vaca se pasteurizó recolectada durante el segundo día de muestreo en la lechería, las muestras se pasteurizaron en un Erlenmeyer de 1000 ml, luego se dividieron en fraccionaron de 50 ml.

Los resultados del número de UFC/ml y conteo de colonias de las sub muestras se encuentran en la Tabla N°16.

Los cálculos para el número de UFC/ml se realizaron haciendo uso de la misma fórmula y siguiendo el mismo procedimiento que en el Ensayo I.

Tabla N°16 Resultado para el conteo de colonias para leche pasteurizada

Número de fracción	Dilución 10^{-1}			Resultados
	Volumen del inóculo			Límite Máximo permitido de <i>Staphylococcus aureus</i> 10^2 UFC/ml
	0.3	0.3	0.4	
1	0	0	0	<10 UFC/ml
2	0	0	0	<10 UFC/ml
3	0	0	7	175 UFC/ml
4	0	0	1	25 UFC/ml
5	0	0	0	<10 UFC/ml
6	0	0	0	<10 UFC/ml
7	0	0	0	<10 UFC/ml
8	0	0	1	25 UFC/ml
9	0	0	0	<10 UFC/ml
10	0	0	0	<10 UFC/ml
11	0	0	0	<10 UFC/ml
12	0	0	0	<10 UFC/ml
13	0	0	0	<10 UFC/ml
14	0	0	0	<10 UFC/ml
15	0	0	0	<10 UFC/ml
16	0	0	0	<10 UFC/ml
17	0	0	0	<10 UFC/ml
18	0	0	0	<10 UFC/ml
19	0	0	0	<10 UFC/ml
20	0	0	0	<10 UFC/ml

En el Ensayo II se detectó una muestra que se sale de la especificación del RTCA que es de 102 UFC/ml. Esta muestra contiene 175 UFC/ml.

Este resultado pudo deberse a contaminación por parte del analista durante la manipulación en el laboratorio de la muestra de leche pasteurizada, ya que la indumentaria o las instalaciones que utilizó, no le permiten proteger la integridad microbiológica de muestra durante el análisis.

Se analizaron 40 muestras de leche pasteurizada, 4 presentaron crecimiento de *Staphylococcus aureus* con un número de unidades formadoras de colonias menor de 102 UFC/ml es decir el 97.5% cumple con los límites microbiológicos establecidos por el RTCA. Mientras que en 1 muestra el crecimiento fue significativo excediendo 102 UFC/ml, indicando que el 2.5% de las muestras no cumplen con el RTCA.

5.3. Evaluación de la resistencia microbiana del *Staphylococcus aureus* por medio del método de Kirby Bahuer

Se realizó la evaluación de la resistencia microbiana del *Staphylococcus aureus* aislado de muestras de leche cruda de vaca. Ver Anexo N°16. De las 15 vacas muestreadas se obtuvieron 60 muestras de las cuales 22 muestras corresponden a muestras con mastitis y 38 a muestras de tetas sin mastitis. En 57 muestras hubo crecimiento del microorganismo y se realizó el proceso para la evaluación de la resistencia microbiana.

A partir de la cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de leche cruda de vaca. (Figura N°48). Se realizó la preparación del estándar de turbidez y la suspensión de cada cepa aislada. Ver Figura N°49.

Luego se procedió a la inoculación de placas y colocación de discos de antibiótico sobre Agar Muller Hinton. Ver Figura N°50. Los discos de antibiótico utilizados fueron: Penicilina G, Oxitetraciclina y Tetraciclina. Estos antibióticos son los más utilizados en la lechería para el tratamiento de la mastitis.

Después del periodo de incubación se realizó la medición de los halos de inhibición haciendo uso del pie de rey y cuenta colonias. Ver Figura N° 51.

Los resultados obtenidos para la medición de los halos se tabularon por separado para cada antibiótico. La tabla contiene el número de muestra, la medida del halo y los límites para determinar si la muestra es Resistente, Intermedia o Sensible. La tabla de interpretación de la medida de los halos se encuentra en el Anexo N°17.

En la evaluación de la resistencia de la cepa de *Staphylococcus aureus* aislada para cada antibiótico, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Penicilina G (P10 U)

La potencia de la Penicilina G es de 10 U en discos que ya venían impregnados con el antibiótico. Los resultados de la medida de halos y la resistencia microbiana se refleja en la Tabla N°17

Tabla N°17 Medida de halos de inhibición de Penicilina G

Penicilina G P10 U				
N° Muestra	Medida del halo (mm)	Resistente	Intermedio	Sensible
		≤14		≥15
1	42			x
2	46			x
3	38			x
4	8	x		
5	46			x
6	19			x
7	13	x		
8	23			x
9	27			x
10	42			x
11	31			x
12	42			x
13	21			x
14	42			x
15	23			x
16	28			x
17	31			X
18	22			X
19	19			X
20	42			X
21	30			X
22	26			X
23	18			X
24	21			X

Tabla N° 17 (continuación)

25	35			X
26	40			X
27	25			X
28	20			X
29	17			X
30	29			X
31	27			X
32	30			X
33	40			X
34	32			X
35	9	x		
36				
37	41			X
38	37			X
39				
40				
41	40			X
42	8	x		
43	37			X
44	25			X
45	39			X
46	39			X
47	37			X
48	26			X
49	35			X
50	40			X
51	20			X
52	39			X
53	41			X
54	42			X
55	39			X
56	22			X
57	40			X
58	38			X
59	39			X
60	39			X

Los resultados obtenidos demuestran que 4 de las 60 muestras presenta un halo menor o igual a 14 mm lo que indica que la cepa es Resistente a la Penicilina G, 56 muestras tienen un halo mayor o igual a 15 mm lo que indica que la cepa es Sensible al antibiótico utilizado.

De estos datos se obtuvo un porcentaje que se refleja en la Figura N°14.

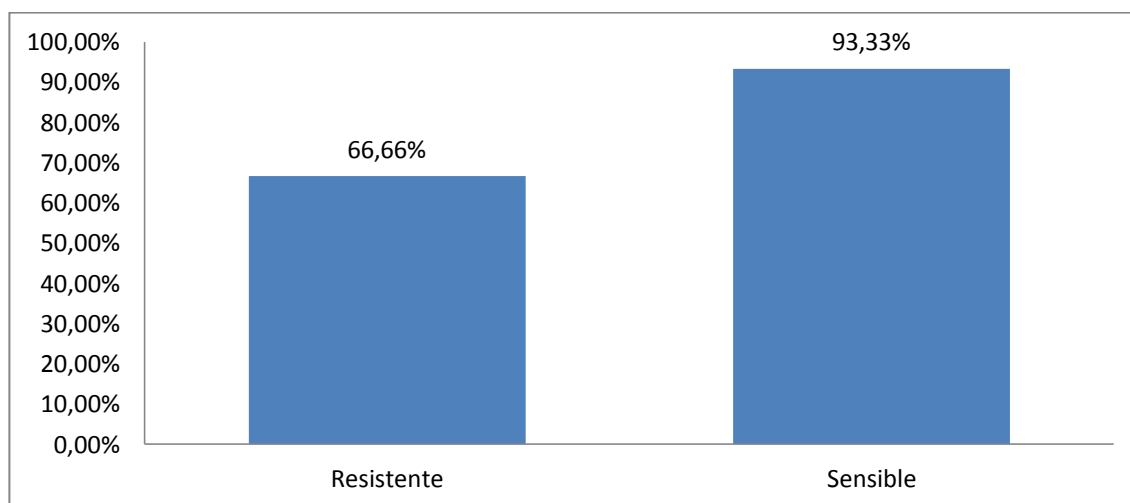


Figura N°14 Resultado de Resistencia microbiana de las cepas ante P10 U

El 6.66 % de las muestras mostraron resistencia y la prueba de coagulasa resultó positiva. El 93.33% de las muestras mostraron ser sensibles a el antibiótico en cuestión y el resultado de coagulasa fue negativo.

En las cepas que mostraron resistencia a la Penicilina G el antibiótico no será el efectivo para tratar la mastitis, en cambio para las cepas sensibles puede ser una alternativa útil y confiable.

Los medicamentos con Penicilina G que se utilicen para el tratamiento de la mastitis serán efectivos solo para las cepas sensibles al antibiótico.

- Oxitetraciclina OT30UG

Es uno de los antibióticos más utilizados en el tratamiento de la mastitis, su potencia es de 30 microgramos. La medida de los halos y su rango de resistencia microbiana, se encuentran en la Tabla N°18.

Tabla N°18 Medida de halos de inhibición de Oxitetraciclina

Oxitetraciclina OT 30 UG				
		Resistente	Intermedio	Sensible
N° Muestra	Medida del halo (mm)	≤14	15-18	≥19
1	30			X
2	40			X
3	No presenta halo	x		
4	No presenta halo	x		
5	37			X
6	No presenta halo	x		
7	No presenta halo	x		
8	33			X
9	8	x		
10	No presenta halo	x		
11	8	x		
12	No presenta halo	x		
13	8	x		
14	No presenta halo	x		
15	8	x		
16	15		x	
17	7	x		
18	25			X
19	32			X
20	17		x	
21	8	x		
22	8	x		
23	8	x		
24	20			X
25	11	x		
26	27			X

Tabla N° 18 (continuación)

27	10	x		
28	8	x		
29	8	x		
30	11	x		
31	26			X
32	18		x	
33	15		x	
34	30			X
35	No presenta halo	x		
36				
37	7	x		
38	7	x		
39				
40				
41	33			X
42	27			X
43	7	x		
44	8	x		
45	No presenta halo	x		
46	No presenta halo	x		
47	No presenta halo	x		
48	7	x		
49	7	x		
50	No presenta halo	x		
51	28			X
52	27			X
53	No presenta halo	x		
54	No presenta halo	x		
55	No presenta halo	x		
56	No presenta halo	x		
57	No presenta halo	x		
58	No presenta halo	x		
59	28			X
60	28			X

El resultado de las muestras analizadas es que un total de 18 muestras no presentan halo de inhibición; esto es un indicador crítico de que la cepa es totalmente resistente a la Oxitetraciclina por lo tanto este antibiótico no estaría curando con la mastitis. Se encontró que 19 muestras tienen un halo menor que 14 mm lo que está indicando resistencia al antibiótico ensayado. El total de muestras que presentaron tener una sensibilidad intermedia fueron 4 muestras y 15 presentaron ser sensibles a la Oxitetraciclina. Estos datos se graficaron y se presentan en la Figura N° 15

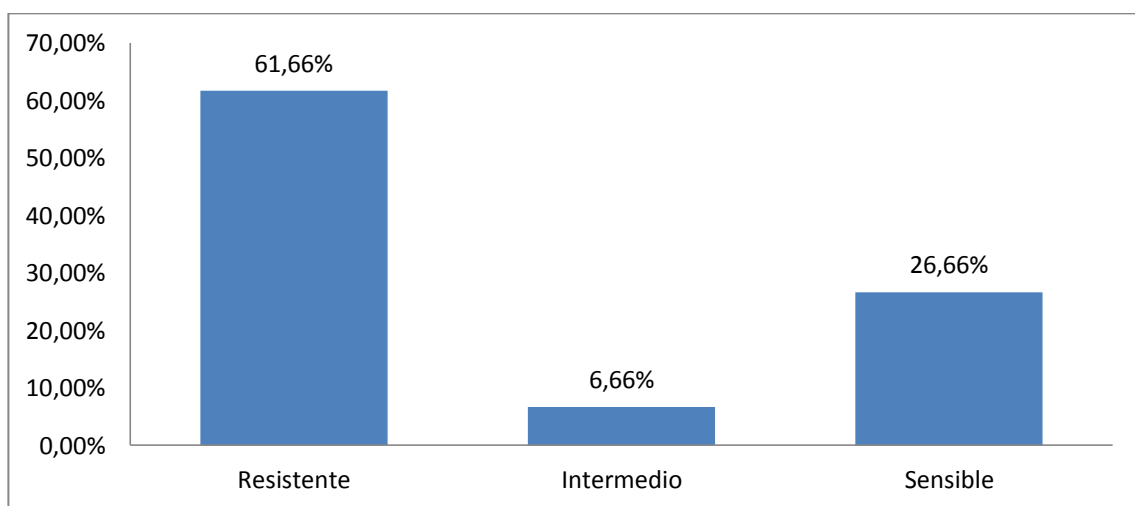


Figura N° 15 Resultado de la Resistencia microbiana de las cepas ante OT30

En total son 37 muestras que presentan resistencia a la Oxitetraciclina, es un número muy grande y un buen indicador de un posible abuso de este antibiótico en el tratamiento de la mastitis. El 61.66% de las muestras mostraron resistencia y la prueba de coagulasa resulto negativa. El 6.66% mostró una resistencia intermedia y para la prueba de coagulasa fueron negativas. El 26.66% de las muestras mostraron ser sensibles a el antibiótico en cuestión y el resultado de coagulasa fue negativo.

- Tetraciclina

La Tetraciclina es un antibiótico utilizado para el tratamiento de mastitis, su potencia es de 30UG y durante el ensayo para determinar la resistencia bacteriana de la cepa aislada de cada muestra, para la Tetraciclina se obtuvieron los resultados reflejados en la Tabla N°19.

Tabla N°19 Medida de halos de inhibición de Tetraciclina

Tetraciclina TE 30 UG				
N° Muestra	Medida del halo (mm)	Resistente	Intermedio	Sensible
		≤14	15-18	≥19
1	31			X
2	42			X
3	10	x		
4	13	x		
5	37			X
6	8	x		
7	8	x		X
8	35			X
9	10	x		
10	10	x		
11	11	x		
12	9	x		
13	9	x		
14	8	x		
15	11	x		
16	10	x		
17	28			X
18	22			X
19	23			X
20	15		x	
21	30			X
22	27			X
23	11	x		
24	35			X

Tabla N° 19 (continuación)

25	20			x
26	22			x
27	17		x	
28	30			x
29	25			x
30	22			x
31	28			x
32	30			x
33	22			x
34	32			x
35	9	x		
36				
37	10	x		
38	9	x		
39				
40				
41	36			x
42	29			x
43	8	x		
44	10	x		
45	8	x		
46	7	x		
47	9	x		
48	8	x		
49	10	x		
50	28			x
51	30			x
52	28			x
53	9	x		
54	8	x		
55	8	x		
56	7	x		
57	7	x		
58	7	x		
59	29			x
60	30			x

Se analizaron 60 muestras de las cuales 29 muestras resultaron con una medida de halo menor a 14 mm lo que es indicador de resistencia al antibiótico. Las muestras que presentaron un halo entre 15 – 18 mm se consideran como sensibilidad intermedia, y son un total de 2 muestras.

Por otra parte 27 muestras tuvieron un halo mayor a 19 mm y se consideran como sensibles. Se obtuvieron los porcentajes de estos datos y se relejan en la Figura N°16.

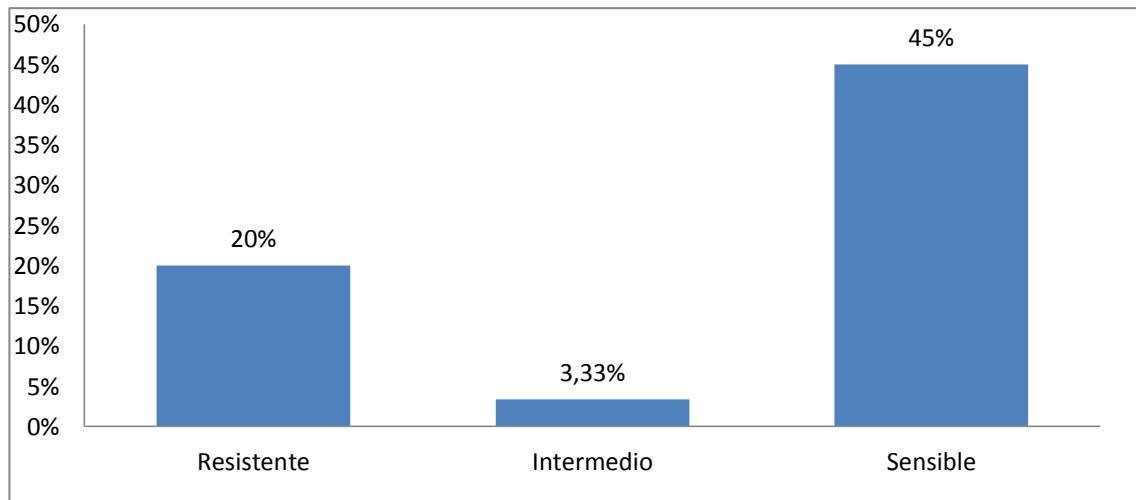


Figura N°16 Resultado de la Resistencia microbiana de la cepa ante TE30

El 20% de las muestras mostraron resistencia y la prueba de coagulasa resulto negativa. El 3.33% mostró una resistencia intermedia y para la prueba de coagulasa fue negativa. El 45% de las muestras mostraron ser sensibles al antibiótico en cuestión y el resultado de coagulasa fue negativo.

El uso de este antibiótico se puede considerar como aceptable ya que la mayoría de las muestras resultaron ser sensibles al antibiótico.

Los resultados tan cercanos entre las muestras resistentes y sensibles, debe tomarse en cuenta para la aplicación de este antibiótico porque los tratamientos

pueden ser efectivos en una parte de las vacas con mastitis, mientras que para las que presentan sensibilidad, no tendría el mismo efecto.

Para un mejor análisis de los resultados se realizó un consolidado entre los tres antibióticos analizados:

- Penicilina G
- Oxitetraciclina
- Tetraciclina

Con el fin de relacionar a cuál de ellos presenta mayor resistencia y sensibilidad, las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestras de leche cruda de vaca.

El antibiótico al que la cepa de *Staphylococcus aureus* presentó mayor sensibilidad fue la Penicilina G y se refleja en la Tabla N° 20.

Tabla N°20 Muestras sensibles a los diferentes antibióticos.

Antibiótico	Porcentaje	Número de muestras
Penicilina G	59.99 %	56
Oxitetraciclina	27.27 %	27
Tetraciclina	16.16 %	16

Los datos de la Tabla N°20 se graficaron y se observan en la Figura N°47

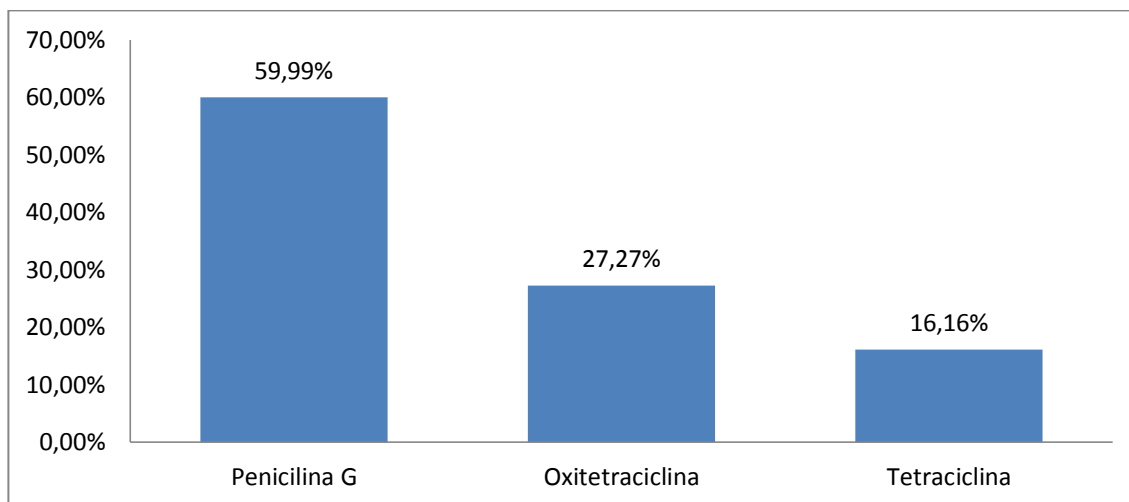


Figura N°17 Antibiótico al que la cepa aislada mostró mayor sensibilidad.

Al antibiótico al que la cepa de *Staphylococcus aureus* mostró mayor resistencia fue a la Oxitetraciclina. El número de muestras resistentes a cada antibiótico de muestra en la Tabla N°21

Tabla N°21 Muestras resistentes a los diferentes antibióticos.

Antibiótico	Porcentaje	Número de muestras
Penicilina G	5.71 %	4
Oxitetraciclina	41.43 %	29
Tetraciclina	52.86 %	37

Estos datos se graficaron y se representan en la Figura N°18

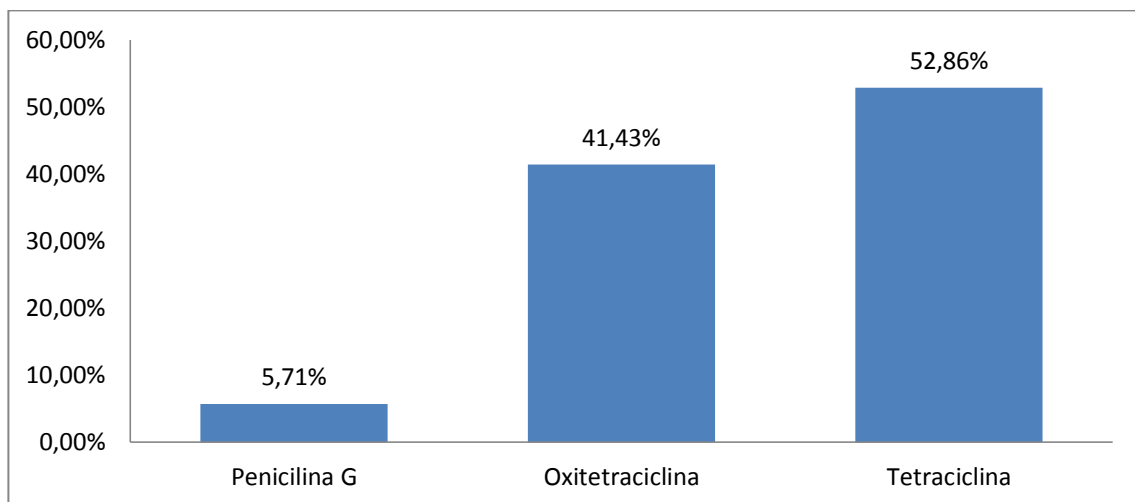


Figura N°18 Antibiótico al que la cepa aislada mostró mayor resistencia.

El uso de la Tetraciclina pueda ser que se haya alternado con la Oxitetraciclina y como ambas son Tetraciclinas los datos son muy parecidos, pero representa un mayor grado de sensibilidad la Tetraciclina, con respecto a la Oxitetraciclina.

Las placas con el número de muestra 36, 39 y 40 no se realizó la prueba de multiresistencia debido a que durante el aislamiento de la bacteria, no hubo crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Esto pudo deberse a fallos durante la inoculación o la ausencia de el microorganismo en las muestras.

5.4. Comparación de la multiresistencia a los antibióticos en *Staphylococcus aureus* cepa control ATCC 29737

Se comparó la resistencia bacteriana con una cepa control ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus*. La cepa ATCC sometió a evaluación de la resistencia a los antibióticos utilizados para evaluar la resistencia de la cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de las muestras de leche cruda. Anexo N°18.

Los resultados de la resistencia para cada antibiótico se tabularon y se presentan a continuación:

- Penicilina G

La cepa control de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 presenta sensibilidad a este antibiótico. Para la prueba de coagulasa resultado positiva. Los resultados se presentan en la Tabla N°22

Tabla N°22 Medida de halo de inhibición de Penicilina G ante cepa ATCC 29737

Penicilina G				
		Resistente	Intermedio	Sensible
N° Muestra	Medida del halo (mm)	≤14		≥15
ATCC	38			X
ATCC	40			X

- Oxitetraciclina

La cepa control de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 presenta sensibilidad a este antibiótico. Para la prueba de coagulasa resultado positivo. Los resultados se presentan en la tabla N°23

Tabla N°23 Medida de halo de inhibición de Oxitetraciclina ante cepa ATCC 29737

Oxitetraciclina				
		Resistente	Intermedio	Sensible
N° Muestra	Medida del halo (mm)	≤14	15-18	≥19
ATCC	28			X
ATCC	30			X

- Tetraciclina

La cepa control de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 presenta sensibilidad a este antibiótico. Para la prueba de coagulasa resulto positiva. Los resultados se presentan en la Tabla N°24.

Tabla N°24 Medida de halo de inhibición de Tetraciclina ante cepa ATCC 29737

Tetraciclina				
		Resistente	Intermedio	Sensible
N° Muestra	Medida del halo (mm)	≤14	15-18	≥19
ATCC	29			X
ATCC	32			X

La cepa ATCC mostró ser sensible a los tres antibióticos ensayados, esto se debe a que la cepa no ha sido sometida a ningún otro antibiótico y por lo tanto no ha creado mecanismos de resistencia que impidan hacer su labor de inhibición al antibiótico. Por esta razón se hizo el ensayo con una cepa ATCC para tomarla como cepa control para la comprobar la acción del antibiótico

5.5. Determinación de la presencia o ausencia de restos de antibióticos en las muestras de leche cruda de vaca por medio del Kit rápido SnapDuo Tetra-Beta ST.

Luego del tiempo de retiro de los antibióticos, se determinaron residuos de ellos en las muestras de leche cruda que provenían de vacas con tetas enfermas de mastitis y que habían sido tratadas con antibióticos.

Para el desarrollo de esta prueba se utilizó para cada muestra el Kit rápido SnapDuo Tetra-Beta ST (Ver Figura N°48). El resultado se verificó por medio de una reacción de cambio de color.



Figura N°19 Kit rápido SnapDuo Tetra-Beta ST



Figura N°20 Utilización del Kit rápido SnapDuo Tetra-Beta ST

Se realizó la lectura de los resultados (Figura N°52)

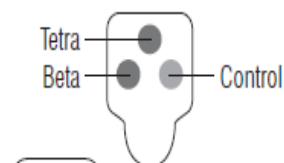


Figura N° 21 Lectura de resultados por medio del Kit rápido SnapDuo Tetra-Beta ST

Luego se procedió a la interpretación de los resultados por medio de la tabla de referencia del Kit rápido.

Resultado negativo tanto para Beta como para Tetra

Ambos puntos de la muestra son más oscuros o iguales al punto del control.

**Resultado positivo tanto para Beta como para Tetra**

Ambos puntos de la muestra son más claros que el punto del control.

**Beta positivo, Tetra negativo**

Si el punto de la muestra beta es más claro que el punto del control, entonces la muestra es positiva para beta-lactamas. Si el punto de la muestra tetra es más oscuro o igual al punto del control, entonces la muestra es negativa para tetraciclinas.

**Tetra positivo, Beta negativo**

Si el punto de la muestra tetra es más claro que el punto del control, entonces la muestra es positiva para tetraciclinas. Si el punto de la muestra beta es más oscuro o igual al punto del control, entonces la muestra es negativa para beta-lactamas.



En la determinación de ausencia o presencia de antibióticos en leche cruda de vaca se analizaron un total de 22 muestras que provenían de tetas que habían sido tratadas con antibióticos para el tratamiento de mastitis. Los resultados se especifican en la Tabla N°25.

Tabla N°25 Muestras analizadas para restos de antibióticos.

Número de muestras		Porcentaje
Positivas	6	27.27 %
Negativas	16	72.73 %

Estos resultados se graficaron y se observan en la Figura N°22

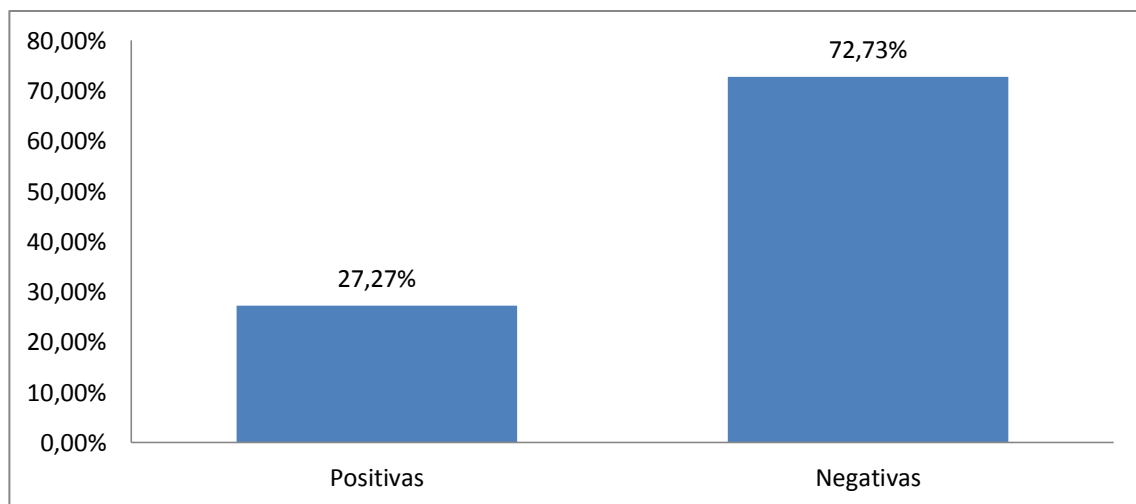


Figura N°22 Porcentaje de muestras con ausencia o presencia de restos de antibióticos.

Como resultado se obtuvo que el 27.27 % de las muestras contenían restos de antibióticos y el 72.73% no contenían restos de antibióticos.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0. CONCLUSIONES

1. Al realizar la lista de chequeo se pudo obtener información muy importante a cerca del cumplimiento de las condiciones higiénicas de la lechería como son: el personal 20%, alrededores 66.66%, operaciones sanitarias 33.33%, equipo y utensilios 100%, producción y control de procesos 33.33%. Además evidenciar el uso irracional y empírico de los antibióticos para tratar la mastitis ya que muchas veces el veterinario no es quien elige el tratamiento para las vacas.
2. El conteo de *Staphylococcus aureus* después de la pasteurización indica que el 97.5% de las muestras cumple con la especificación del Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08. para leche fluida pasteuriza estando dentro del rango del límite máximo permitido.
3. Se evaluó la resistencia microbiana de la cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de muestras de leche cruda de vaca a tres antibióticos más utilizados para el tratamiento de la mastitis. Esta cepa aislada mostró resistencia a la Oxitetraciclina y sensibilidad a la Penicilina G y a la Tetraciclina.
4. La Oxitetraciclina es un derivado de la Tetraciclina y a pesar de ello la cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de leche cruda de vaca mostró mayor sensibilidad a la Tetraciclina y una alta resistencia a la Oxitetraciclina.
5. La presencia de restos de antibióticos en leche cruda de vaca tiene efecto negativo en la salud pública causando reacciones de hipersensibilidad y resistencia a bacterias patógenas. En la industria

láctea afecta los cultivos iniciadores empleados en la producción de derivados lácteos fermentados, como queso y yogurt ya que estos son extremadamente sensibles a bajas concentraciones.

6. Las cantidades máximas permitidas en la ingesta de residuos de estos antibióticos según lo establece el Codex Alimentarius es para residuos de Bencilpenicilina (residuo de la Penicilina G) 30 µg, Tetraciclina y Oxitetraciclina 100µg/Kg.
7. Se comprobó la resistencia microbiana a los mismos antibióticos ensayados en la cepa aislada de leche cruda de vaca, con una cepa control ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus* esta cepa mostró ser sensible a los tres antibióticos ensayados.
8. Se determinó la presencia de residuos de antibióticos en muestras de leche cruda de vaca, haciendo uso del Kit rápido SnapDuo Tetra-Beta ST. La prueba resultó positiva para el 27.27% de las muestras analizadas.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0. RECOMENDACIONES

1. En una futura investigación a realizar con cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de leche cruda de vaca se puede determinar la multiresistencia con antibióticos de familias diferentes de Beta Lactámicos y Tetraciclinas.
2. Hacer la adecuada elección del antibiótico a utilizar para el tratamiento de vacas enfermas con mastitis, y cumplir con el diagnóstico del veterinario, respetando el tiempo de administración y las dosis recomendadas para cada tipo de antibiótico, para evitar el uso indiscriminado de antibióticos y no afectar la calidad de la leche.
3. Evitar la retención de leche después del proceso de ordeño asegurando que el ordeño sea completo para prevenir la mastitis en las vacas lecheras.
4. Utilizar Agua potable para el lavado inicial y final de las tetas de las vacas durante el proceso de ordeño y para la limpieza de las áreas utilizadas. Además de lavar y sanitizar los equipos utilizados durante el ordeño. Con el fin de prevenir enfermedades de las vacas y la contaminación de la leche ordeñada.
5. Se recomienda que la leche cruda de vaca no contenga restos de antibióticos ya que afecta tanto al consumidor ocasionando reacciones de hipersensibilidad y resistencia a bacterias patógenas al ser sometidas a concentraciones sub terapéuticas de antibiótico. En la industria láctea afectan ya que se la leche cruda se utiliza con materia prima para la elaboración de derivados lácteos.

6. Realizar los análisis pertinentes a la leche cruda de vaca, para asegurar la calidad de la leche apta para ser utilizada como materia prima, en la industria láctea.

7. Consumir leche que ha pasado por un proceso de pasteurización confiable y así prevenir enfermedades en los consumidores.

BIBLIOGRAFIA

1. Alais, Charles. (1981). Ciencia de la Leche, Principios de la Técnica Lechera, 3ª Impresión. Editorial Continental S.A. de CV. México. Pág. 594.
2. Barrera, Ana M. y Ortez, Erick M. (2012). Determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos y Tetraciclinas en leche cruda de cinco ganaderías ubicadas en el municipio de San Luis Talpa y en leche pasteurizada. Trabajo de Graduación Medicina Veterinaria y Zootecnia, El Salvador Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas.
3. Cavalier, Stephen J. (et al); editor coordinadora, Marie B. Coyle. (2005). Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Disponible en: Library of congress cataloging-in-Publication Data http://cidbimena.desastres.hn/docum/ops/libros/labs_sucep_antimicro.pdf
4. Cedillos, Rosario S. y Guerra, Jessica C. (2012). Determinación de la multirresistencia microbiana del *Staphylococcus aureus*, aislado a partir de diferentes fuentes que intervienen en la elaboración del queso fresco artesanal proveniente de dos queserías. Trabajo de Graduación Licenciatura en Química y Farmacia, El Salvador Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formely NCCLS). (January 2007). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seventeenth Informational Supplement. Disponible en: <http://www.microbiolab-bg.com/CLSI.pdf>

6. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). (2008). Norma Salvadoreña Obligatoria 67.01.01.06 Leche cruda de vaca Especificaciones (Primera Actualización) Editada. Disponible en: <http://osartec.gob.sv/index.php/buscar/finish/3-inventario-nso/47-leche-cruda-de-vaca-especificaciones-primera-actualizacion>
7. Corbellini, Carlos N. La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche. Instituto nacional de tecnología agropecuaria. Proyecto lechero, E.E.A INTA Pergamino. Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <http://por.agro.uba.ar/sites/default/files/agronomia/la-mastitis-bovina-y-su-impacto-sobre-calidad-de-leche.pdf>
8. Food and Agriculture Organization (FAO) y Federacion Internacional de la leche (FIL). (2012). Guía de buenas prácticas en explotaciones lecheras. Directrices FAO: Producción y Sanidad Animal No. 8. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-ba0027s.pdf>
9. Food and Agriculture Organization (FAO). (2009). Directrices para el diseño y la implementación de programas nacionales reglamentarios de aseguramiento de la inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los animales destinados a la producción de alimentos. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/CXG_071s.pdf
10. Frazier, W.C. (2003). Microbiología de los alimentos. 4ta edición. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A. Pág. 547-555.
11. García Rodríguez, José A., Cantón, Rafael, García Sánchez, Elías, Gómez-Lus, María L., Martínez, Luis, Rodríguez Avial, Carmen y Vila,

Jordi. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 11. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Disponible en: http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf

12. Instituto Nicaragüense de apoyo a la pequeña y mediana empresa (INPYME) y Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). Manual de procesamiento lácteo. Disponible en: http://www.jica.go.jp/nicaragua/espanol/office/others/c8h0vm000001q4bc-att/14_agriculture01.pdf
13. Keating, P.F. (2002). Introducción a la lactología. 2da edición. México: Editorial Limusa Noriega. Pág. 15-35
14. La Universidad de Zulia Facultad de Ciencias Veterinarias Departamento de Producción e Industria Animal. Cátedra de Ciencia y Tecnología de la leche. (2003). Introducción al control de calidad de la leche cruda Guía practica. Maracaibo. Disponible en: <http://www.agroca.com.ve/pdf/calidad.de.leche/e6.leche.cruda.pdf>
15. Luquet, F.M. (1991). Leche y productos lácteos, vaca-oveja-cabra. Volumen 1. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A. Pág. 3-88
16. Luquet, F.M. (1993). Leche y productos lácteos, vaca-oveja-cabra. Volumen 2. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.

17. Ministerio de Economía de El Salvador. Dirección de innovación y control de calidad (DICA). Inventa Célula Alimentos y Bebidas. Disponible en: <http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/3372/Pasteurizacion%20Marzo.pdf>
18. Ministerio de Salud de Perú. Norma Sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Disponible en: www.iiap.org.pe/promamazonia/sbiocomercio/.../362.pdf
19. MSc. Elías, Olga L. Laboratorio de Patología Clínica- FM-UNMSM. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria. Laboratorio de Patología Clínica. Evaluación de la presencia de residuos de antibióticos en leche de vacas con una sola aplicación Intramamaria con el producto CEFA MILK® FORTE. QF. Disponible en: http://www.vetermex.com/Pdfs/Trabajos_investigacion/Cefa_Milk_Forte/ANTIBIOTICOS_EN_LECHE.pdf
20. Organización Mundial de la Salud (OMS) y Food and Agriculture Organization (FAO). (2011) Codex Alimentarius. Leche y productos lácteos. Segunda Edición. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/015/i2085s/i2085s00.pdf>
21. Organización Mundial de la Salud (OMS) y Food and Agriculture Organization (FAO). (2014). Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos CAC/MRL 2-2014 Actualizado en la 37.a Sesión de la Comisión del Codex Alimentarius. Disponible en: www.codexalimentarius.org/standards/45/MRL2_s.pdf

22. Parra, María H., Suárez, Lorenzo, Londoño, Julio E., Pérez, Nelson y Rengifo, Guillermo. (2003). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) y Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria. Los residuos de medicamentos en la leche. Problemática y estrategias para su control. Neiva, Colombia. Disponible en:http://agronet.gov.co/www/docs_si2/20061024154510_control%20estrategico%20residuos%20medicamentos%20en%20la%20leche.pdf
23. Prof. Pedrique de Aulacio, Magaly. (2002). Trabajo practico N°3 Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (Antibiograma). Universidad Central de Venezuela. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Antibiograma.pdf
24. Ramírez Amaya, W.J. (2012). Propuesta de un manual de técnicas microbiológicas para los diferentes grupos alimenticios referenciados en las metodologías normalizadas de la administración de drogas y alimentos FDA. Trabajo de Graduación Licenciatura en Química y Farmacia, El Salvador Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia.
25. Roberts, D., W. Hooper y M. Greenwood. (2000). Microbiología practica de los alimentos: Métodos para el examen de microorganismos de los alimentos de interés para la salud pública. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A. Pag.
26. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA – Norma Salvadoreña Obligatoria NSO (RTCA NSO 67.04.50:08) (1996) Alimentos Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos. Disponible en:

<http://www.defensoria.gob.sv/images/stories/varios/RTCA/ALIMENTOS/N SORTCA67.04.50.08CRITERIOS%20MICROBIOLOGICOS.pdf>

27. Serrano Villanueva, J.A. (1996). Determinación de residuos de antibióticos en leche producida en Potrerillos, Cortés, Honduras. Trabajo de Graduación Medicina Veterinaria y Zootecnia, Escuela de Veterinaria. Guatemala. Universidad de San Carlos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_0719.pdf
28. Varnan, Alan .H. Suther J. P. (1994). Leche y Productos Lácteos, Tecnología Química y Microbiológica, Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A. Pág. 1-51
29. Varnan, Alan .H. Suther J. P. (1995). Leche y Productos Lácteos, Tecnología Química y Microbiológica, Zaragoza, España, Editorial Acribia S.A. Pág. 8-29
30. World Health Organization (WHO). (2014). Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. Disponible en: Library Cataloging-in-Publication Data <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>

GLOSARIO (26) (30)

- **Antibiótico:** Sustancias naturales o fabricadas por el ser humano, que matan a ciertos microorganismos o inhiben su crecimiento.
- **Leche cruda:** Es el producto no alterado, no adulterado, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de vacas sanas, que no contenga calostro y que esté exento de color, olor, sabor y consistencia anormales.
- **Leche pasteurizada:** Es aquella leche íntegra o entera, semidescremada o descremada, que ha sido sometida a un tratamiento térmico específico y por un tiempo determinado que asegura la total destrucción de los organismos patógenos que pueda contener y casi la totalidad de los organismos no patógenos, sin alterar en forma considerable su composición, sabor ni valor nutritivo.
- **Mastitis:** reacción inflamatoria de la glándula mamaria. Esta inflamación produce cambios en el tejido glandular y una serie de variaciones en la composición bioquímica de la leche. Cuanto mayor sea la gravedad de la inflamación, más se parecerá la composición de la secreción láctea a la del suero sanguíneo.
- **Multiresistencia Microbiana:** El término resistencia múltiple o multiresistencia se utiliza cuando una cepa bacteriana es resistente a varios antimicrobianos o tipos de antimicrobianos distintos. Por ejemplo, la tuberculosis multiresistente es resistente de forma simultánea a diversos antibióticos que pertenecen a diferentes grupos químicos.

- **Resistencia Microbiana:** es la capacidad que tienen las bacterias de soportar los efectos de los antibióticos destinados a eliminarlas o controlarlas.
- **Teta o cuarterón:** La ubre de la vaca lechera consta de cuatro glándulas mamarias (cuarterones). Cada uno de estos cuatro complejos glandulares es completamente independiente, con su propia estructura secretora y se comunica con el exterior a través de su propio pezón
- **Ubre:** La ubre es el órgano encargado de elaborar y acumular el producto final: la leche. La capacidad productiva del animal y la calidad del producto dependen, en gran medida, del funcionamiento y constitución de este órgano.

ANEXOS



Anexo N°1



**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y CONTAMINACION AMBIENTAL

Tema:

DETERMINACIÓN DE LA MULTIRESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN
CEPA DE *Staphylococcus aureus*, AISLADA DE LECHE CRUDA DE VACA Y
RESTOS DE ANTIBIOTICOS EN LA LECHE OBTENIDA DE UNA LECHERIA
DE EL DEPARTAMENTO DE SANTA ANA

CHECK LIST

PARTE I

- ¿Qué tipo de ordeño realizan en la lechería?
Manual Automatizado
- ¿Qué materiales se utilizan en el ordeño?
- Tipo de estabulación
Abierta Semi cerrada Cerrada
- ¿Se impide el estancamiento de leche en la ubre de la vaca después del ordeño?
SI NO
- ¿Con qué frecuencia se realiza el ordeño?
- ¿El ganado está en constante control por parte de un médico veterinario?
SI NO

7. ¿Cuáles son las enfermedades más frecuentes que afectan al ganado?

8. ¿Cuál es el tratamiento farmacológico para la mastitis?

9. ¿Cuáles son las condiciones de almacenamiento de la leche después del ordeño?

Tiempo	
Temperatura	
Capacidad de los contenedores	
Ubicación de los contenedores	

10. ¿Se realizan pruebas microbiológicas a la leche ordeñada?

SI

NO

11. Mencione el nombre de las pruebas (si es que se hacen)

12. ¿Durante que etapa o porque motivos se puede interrumpir el ordeño?

PARTE II

Secciones:

- a) Personal
- b) Alrededores
- c) Operaciones sanitarias
- d) Equipo y utensilios
- e) Producción y control de procesos

Criterio de respuesta

Se marcará Si, cuando se cumpla a cabalidad con cada criterio. Se elegirá No cuando el criterio no cumpla.

Personal

- Uso correcto de mascarilla, redecilla de pelo, botas y un adecuado vestuario de trabajo Si ____ No ____
- Cabello, barba y uñas recortadas Si ____ No ____
- Se realiza un lavado de manos antes de comenzar el trabajo, después de cada ausencia del lugar de trabajo y cada vez que sea necesario Si ____ No ____
- El personal de la planta no porta joyas, relojes u otros objetos personales que puedan caer en el producto Si ____ No ____
- Mantenimiento y uso de guantes asépticos al momento de manipular directamente el alimento Si ____ No ____

Alrededores

- Malezas debidamente podadas Si ____ No ____
- Depósitos de basura limpios y tapados Si ____ No ____

- Ausencia de acumulación de agua Si ____ No ____

Operaciones sanitarias

- Las paredes, pisos y ventanas, están en buen estado Si ____ No ____
- Los materiales tóxicos de limpieza y desinfección están debidamente almacenados y rotulados Si ____ No ____
- Ausencia plagas, roedores y animales domésticos dentro de la lechería Si ____ No ____
- Los equipos y utensilios son higienizados antes de comenzar con las labores de ordeño Si ____ No ____
- El agua utilizada en el proceso, lavado y recirculación del equipo de ordeño, es potable y limpia Si ____ No ____
- Servicios sanitarios funcionales, en buen estado y bien provistos Si ____ No ____
- Estación de lavado de manos provista de insumos Si ____ No ____
- Recipientes para basura bien tapados Si ____ No ____
- Las mangueras debidamente colocadas en su sujetador Si ____ No ____

Equipo y Utensilios

1. Todos los equipos están en buenas condiciones Si ____ No ____
2. Utensilios en su respectivo lugar y que no se encuentran tirados en el piso Si ____ No ____

Producción y control de procesos

- Registros de análisis microbiológicos de la leche Si ___ No ___
- Material de envase desinfectado antes de utilizarlo Si ___ No ___
- Almacenamiento y transporte de producto terminado se realiza de manera que se evite la contaminación Si ___ No ___

Anexo N°2

Viñeta para la identificación de muestras de leche cruda

CÓDIGO DE MUESTRA _____

HORA DE MUESTREO _____ FECHA _____

ANALISIS REQUERIDOS

RECOLECTOR DE MUESTRA

Anexo N°3
Procedimiento para realizar el aislamiento y confirmación de
colonias de cepa de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche
cruda de vaca

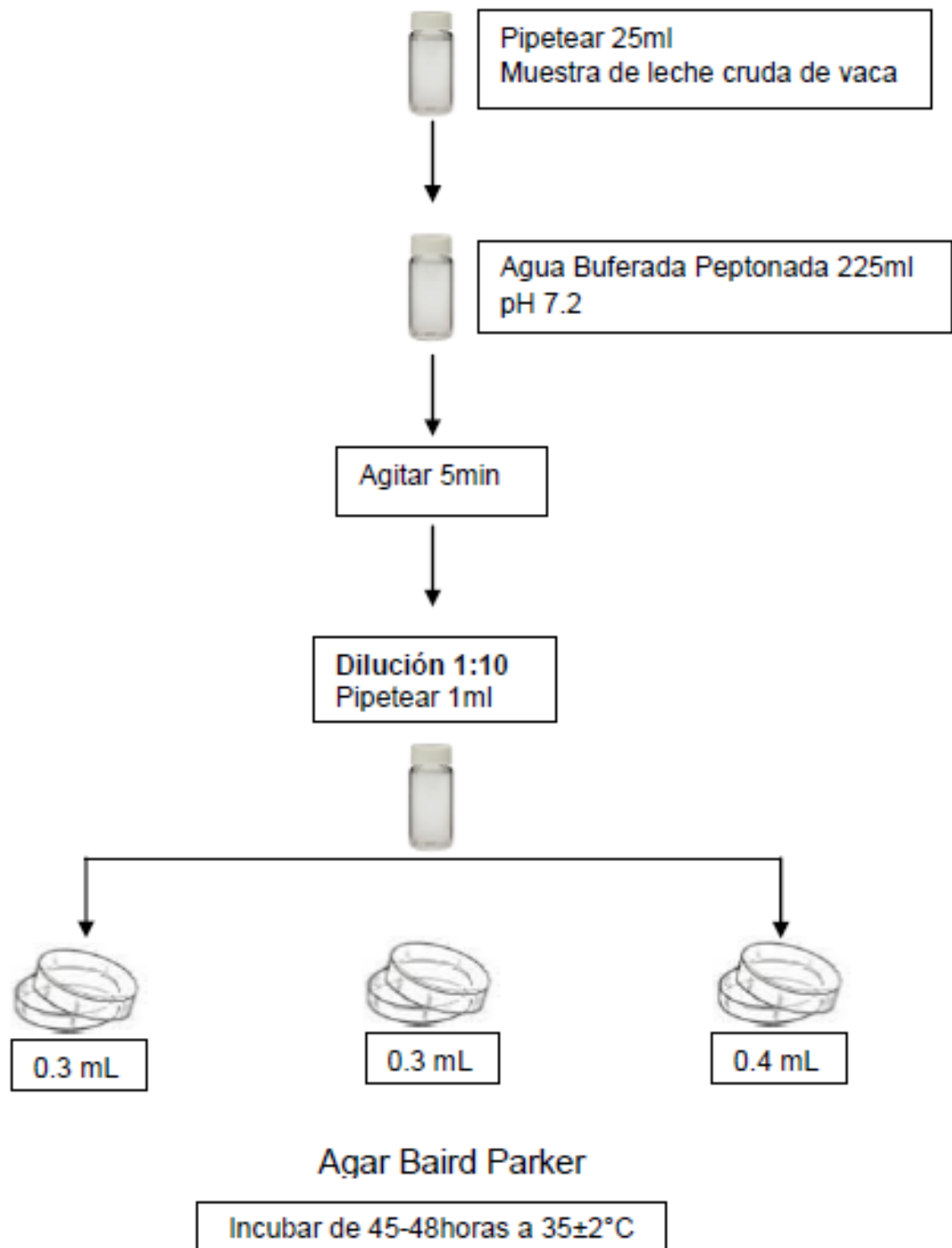


Figura N°23 Esquema de análisis para el aislamiento de cepas de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche cruda de vaca

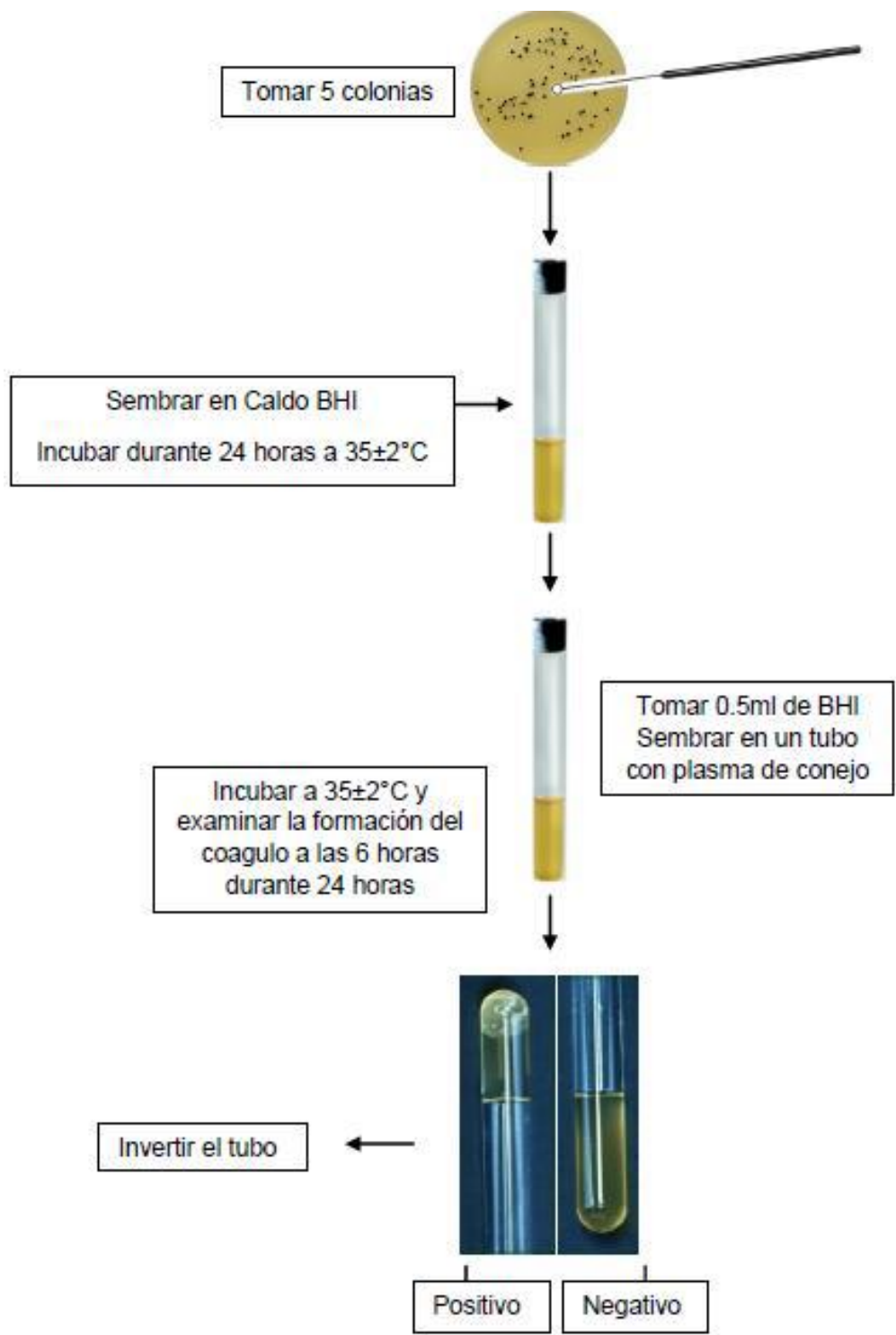


Figura N°24 Esquema de análisis para confirmación de colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* en leche cruda de vaca

Anexo N°4

**Determinación de la multiresistencia tres antibióticos diferentes en
cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de leche cruda de vaca**

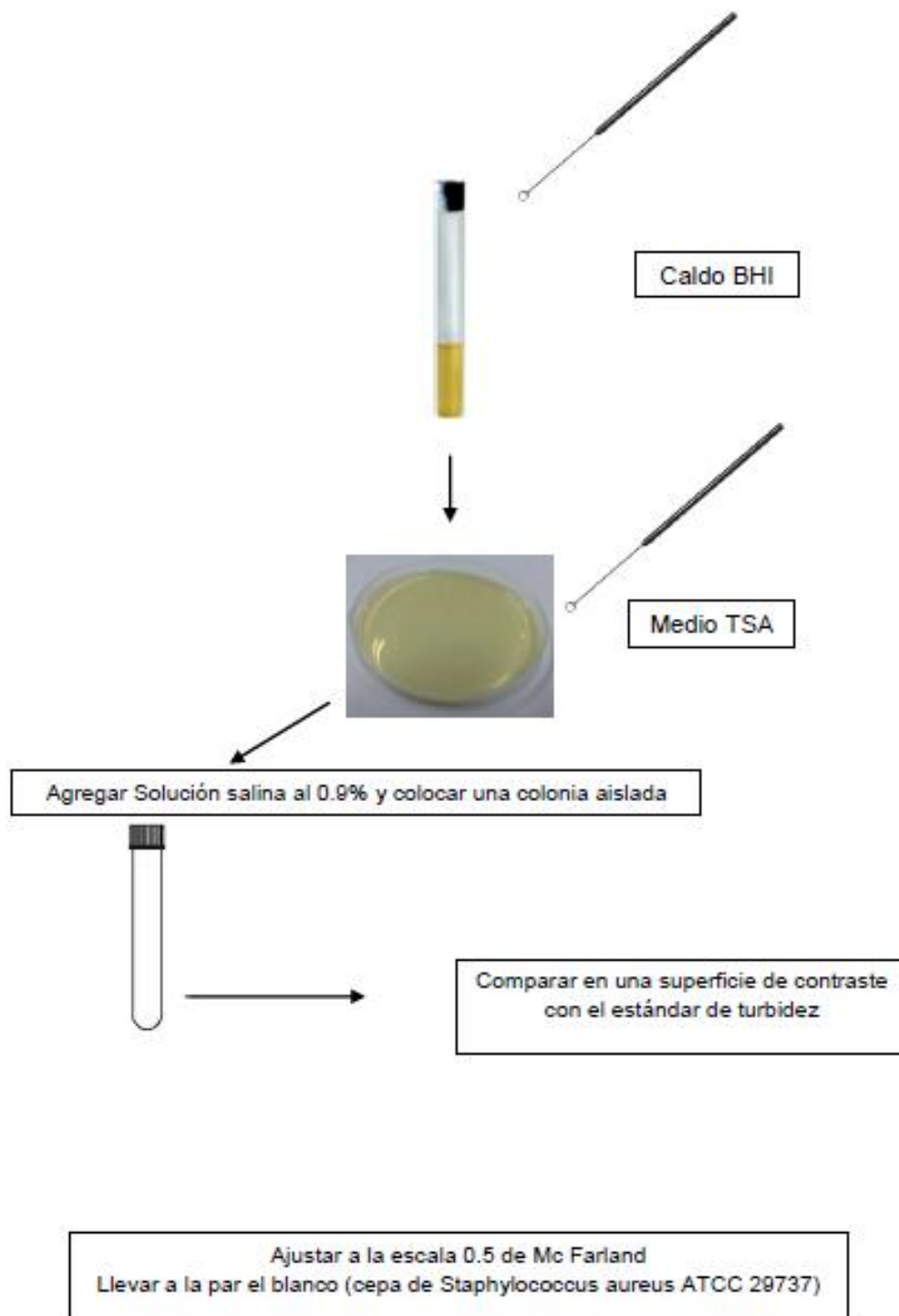


Figura N°25 Esquema de análisis para la preparación del inculo de *Staphylococcus aureus*

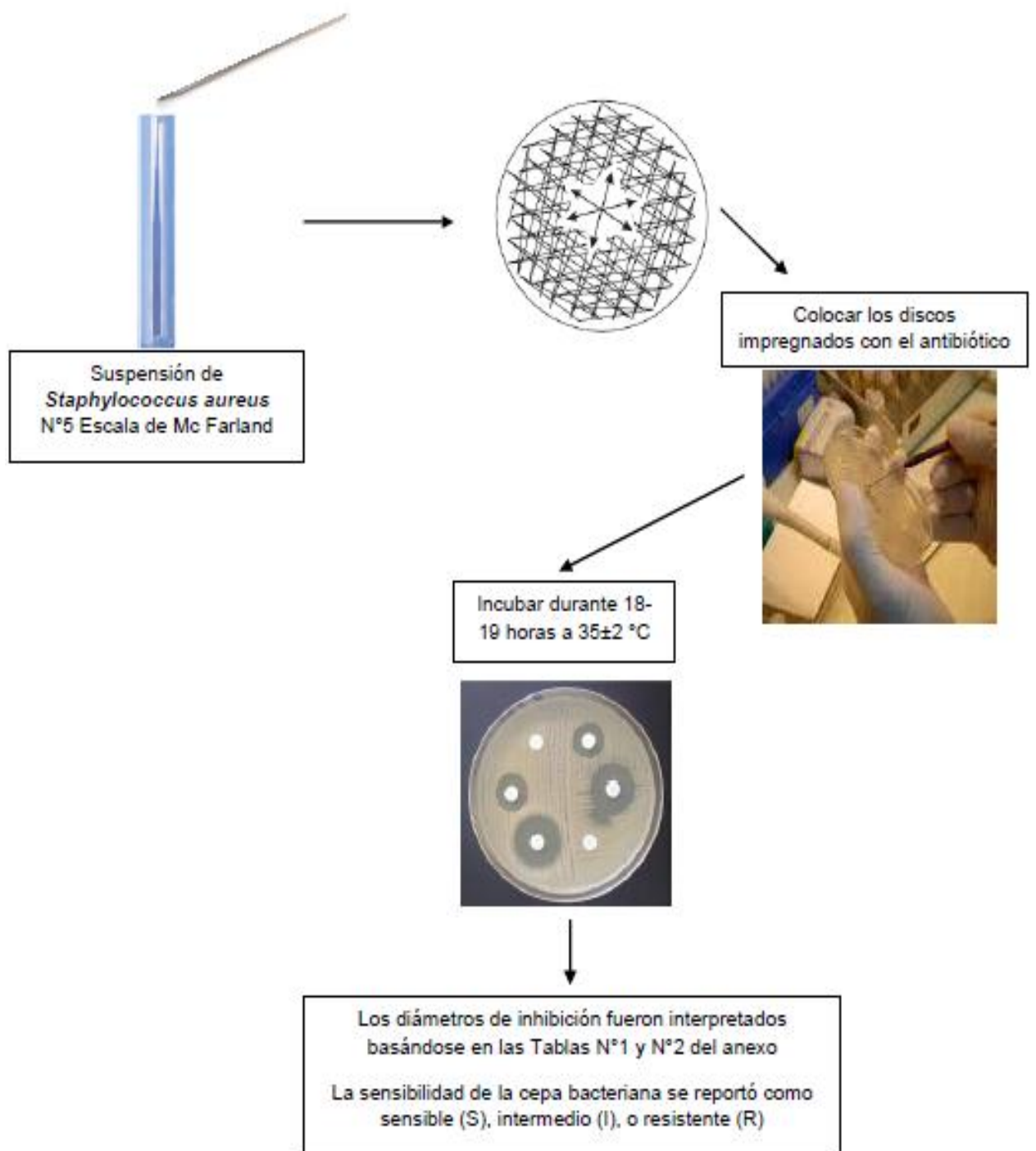


Figura N°26 Esquema de desarrollo de la Prueba de Resistencia Microbiana en cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de leche cruda de vaca

Anexo N°5
**Determinación de la multiresistencia tres antibióticos diferentes en
cepa control ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus***

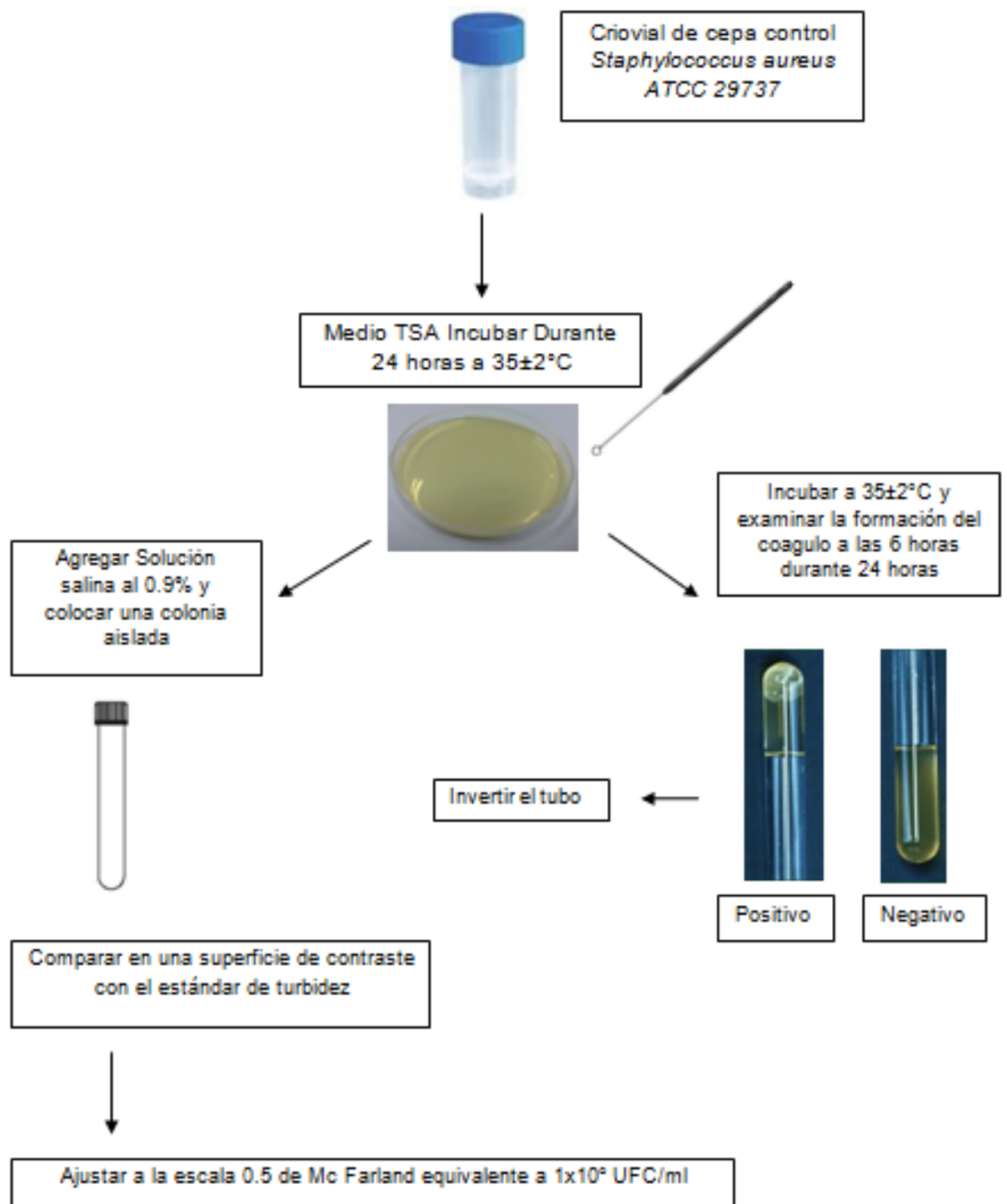


Figura N°27 Esquema de preparación del inóculo de la cepa control ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus*

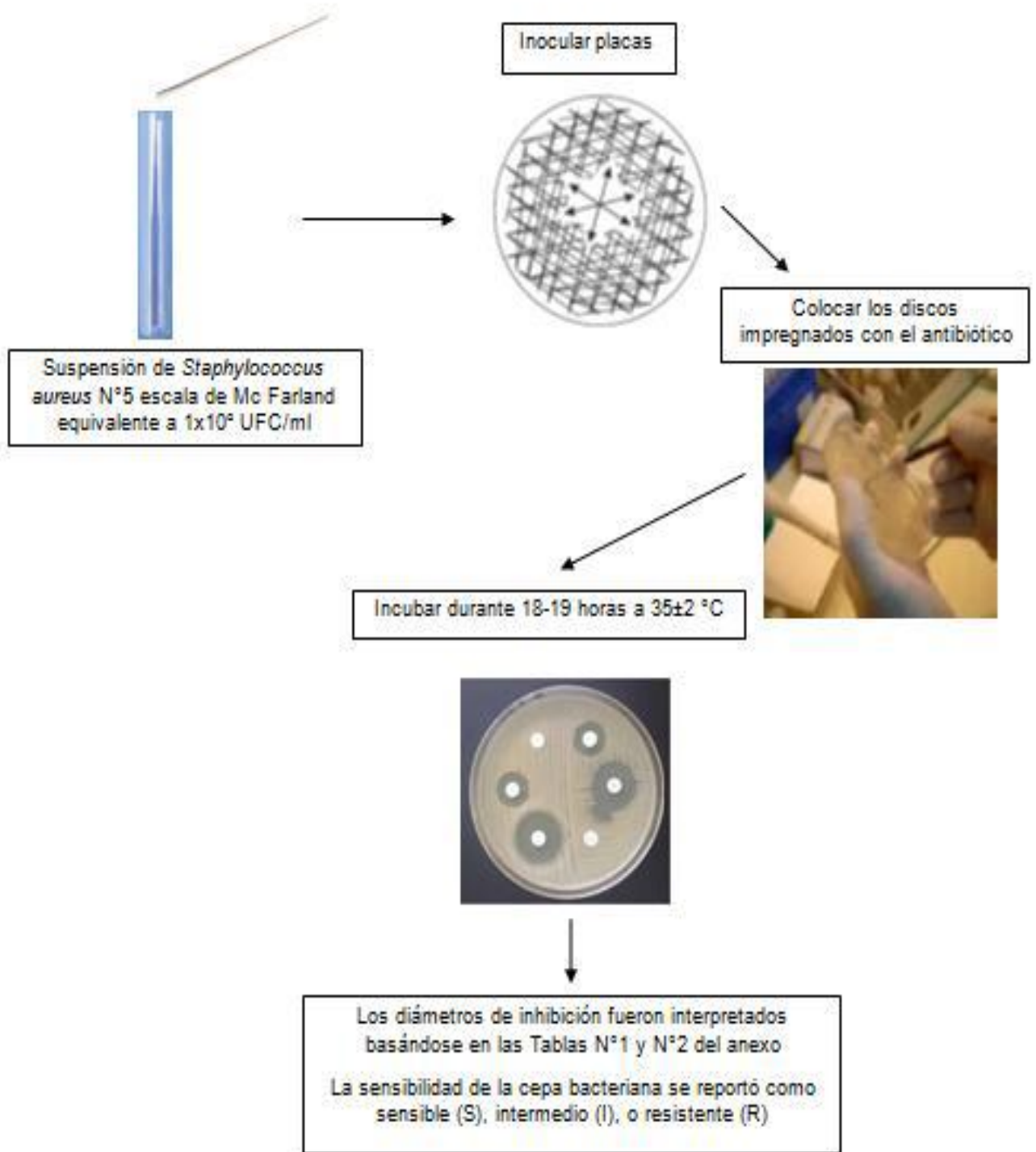


Figura N°28 Esquema de desarrollo de la Prueba de Resistencia Microbiana en la cepa control ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus*

Anexo N°6
Determinación de restos de antibióticos en leche cruda de vaca por
medio del kit SNAPduo Beta-Tetra ST Test

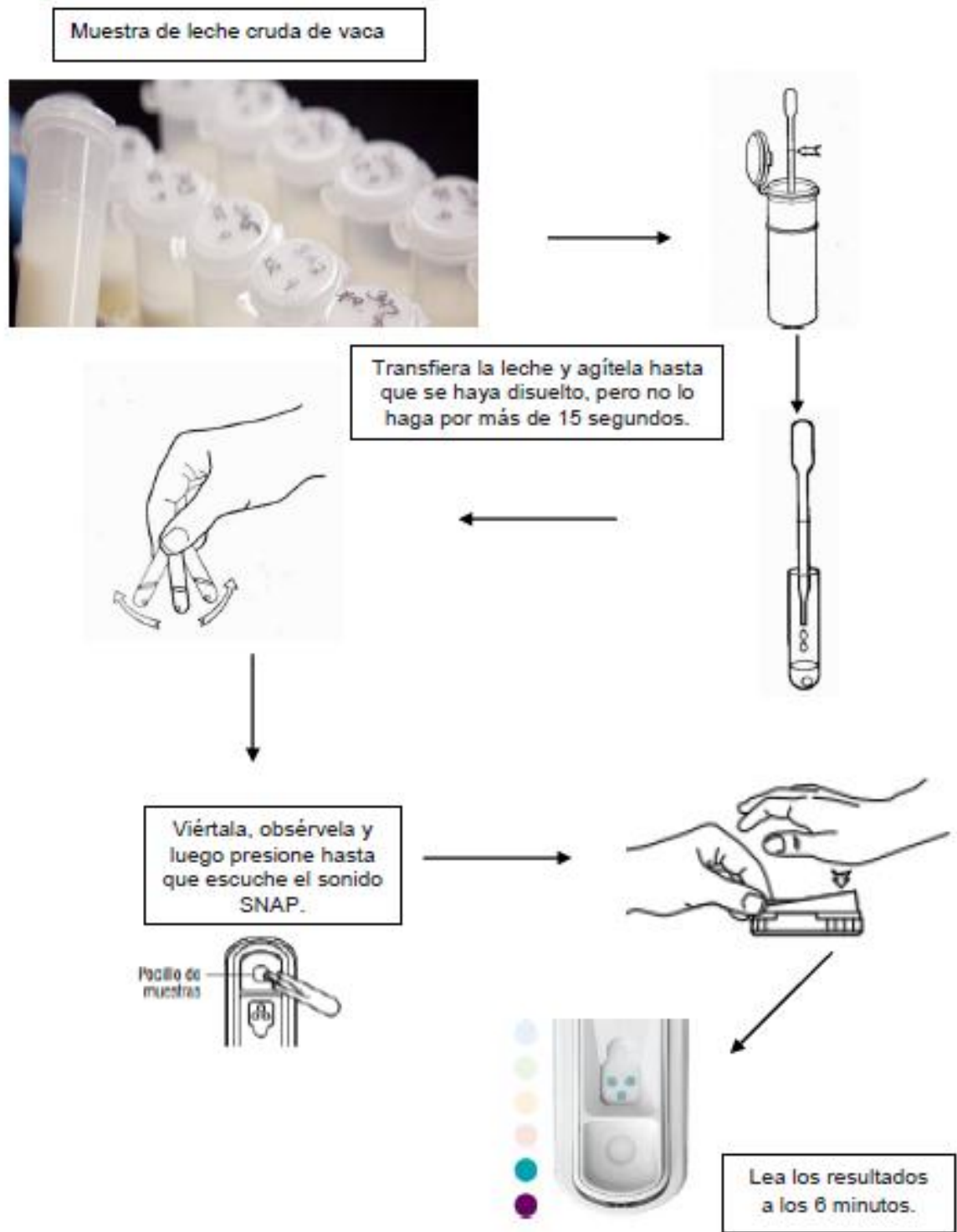


Figura N°29 Esquema de la determinación de restos de antibióticos en leche cruda de vaca por medio del Kit SNAPduo Beta – Tetra ST Test

Anexo N°7
Proceso de pasterización a nivel de laboratorio de leche cruda de vaca



Figura N°30 Esquema del proceso de pasteurización a nivel de laboratorio de leche cruda de vaca

Anexo N°8
Conteo y aislamiento de cepa de *Staphylococcus aureus* en
muestras de leche pasteurizada de vaca

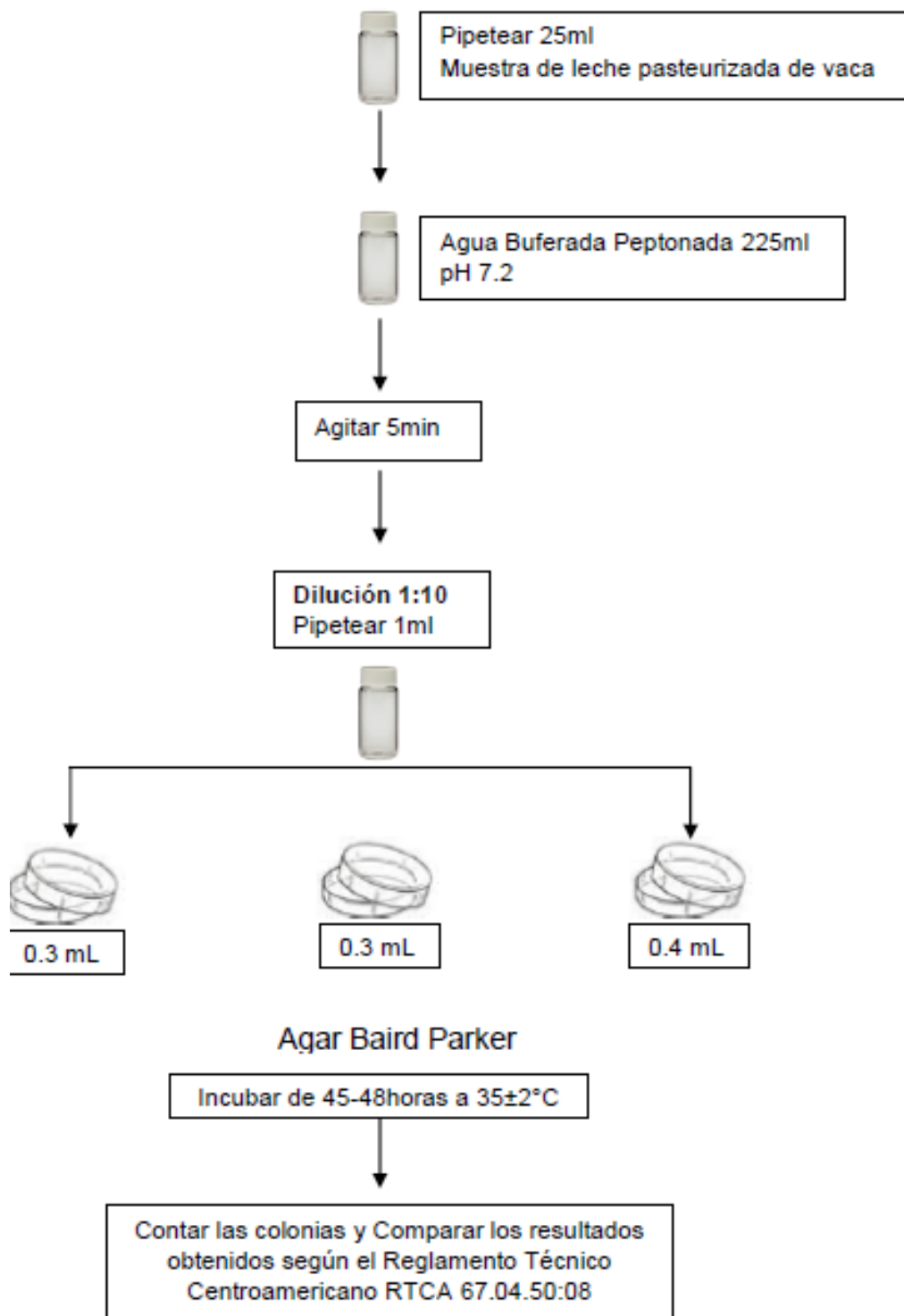


Figura N°31 Esquema de conteo y aislamiento de cepa de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche pasteurizada de vaca

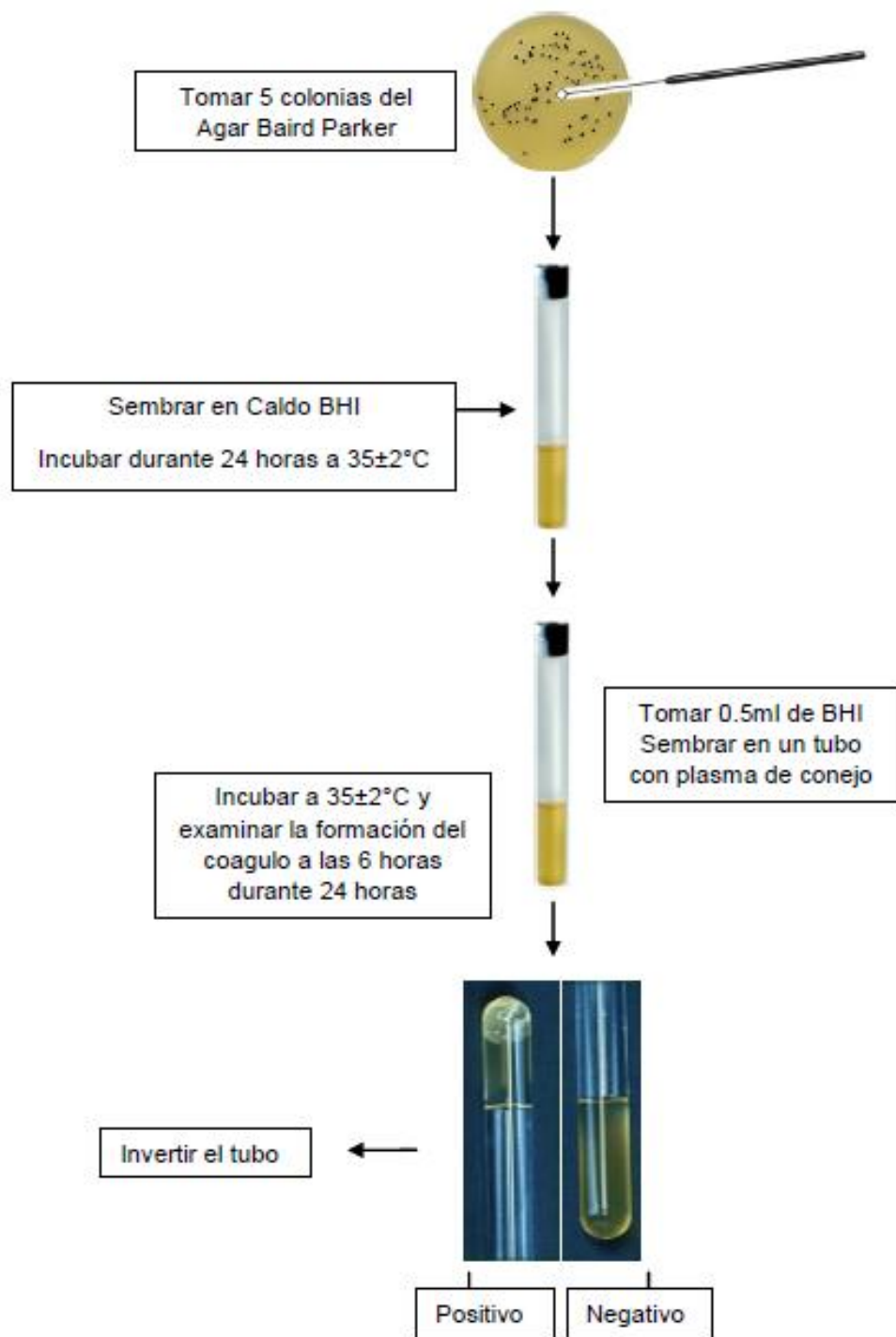


Figura N°32 Esquema para la confirmación de colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche pasteurizada de vaca

Anexo N°9
Ubicación geográfica de la lechería



Figura N°33 Ubicación geográfica de la lechería

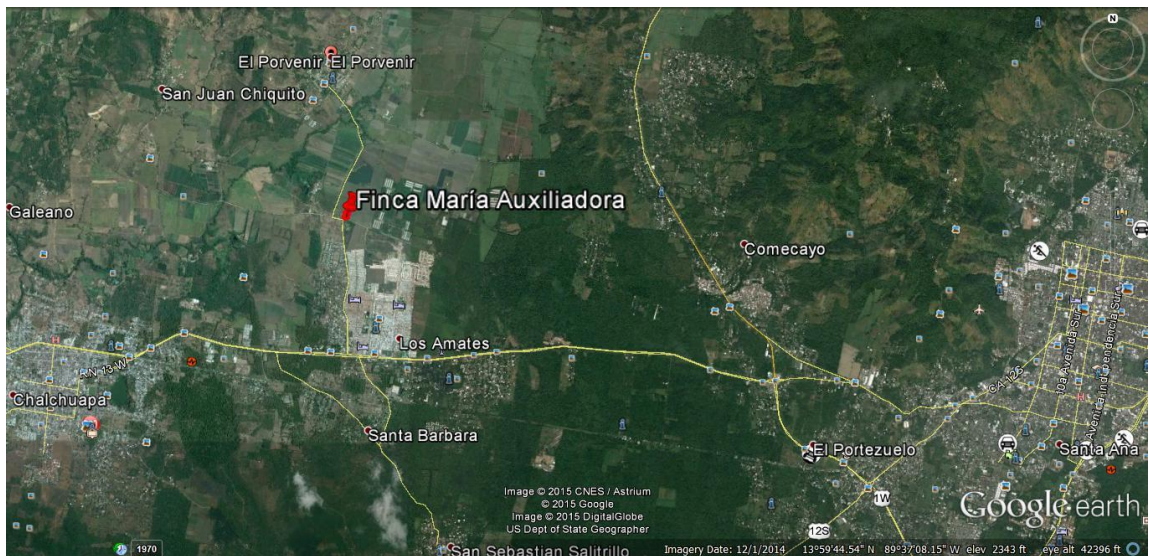


Figura N°34 Ubicación geográfica de la lechería

Anexo N°10
Verificación de las condiciones higiénicas de la lechería



Figura N°35 Fotografía de ordeño: manual



Figura N°36 Fotografía de pezoneras utilizadas en el tipo de ordeño: automatizado



Figura N°37 Fotografía de ordeño automatizado

Anexo N° 11



Figura N°38 Fotografía de condiciones de estabulación del ganado:
Semicerrada

Anexo N° 12



Figura N°39 Fotografía del antibiótico Mastijet Forte administrado por vía intramamaria y utilizado en el tratamiento de la mastitis



Figura N°40 Fotografía del antibiótico Mastilab administrado por vía intramamaria y utilizado en el tratamiento de la mastitis



Figura N°41 Fotografía del antibiótico Streptopen administrado por vía intramuscular y utilizado en el tratamiento de la mastitis

Anexo N° 13



Figura N°42 Fotografía de tanque de almacenamiento de leche ordeñada

Anexo N°14

Aislamiento y cuantificación de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche pasteurizada para comparar si cumple con el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08.



Figura N°43 Fotografía de muestras de leche cruda de vaca

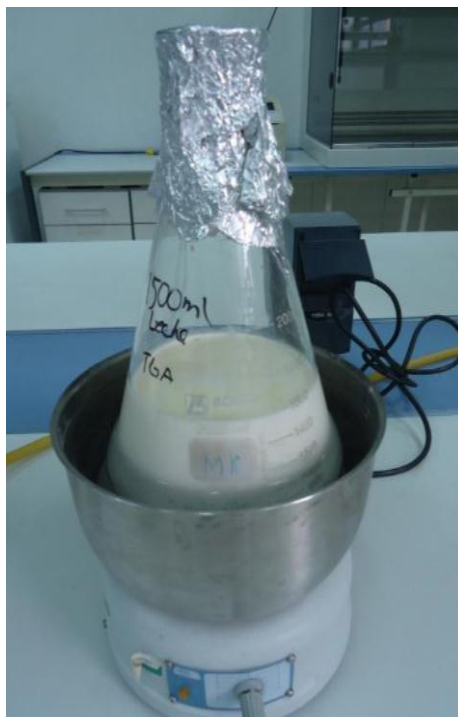


Figura N°44 Fotografía de proceso de pasteurización de leche cruda de vaca



Figura N°45 Inoculación de placas con Agar Baird Parker

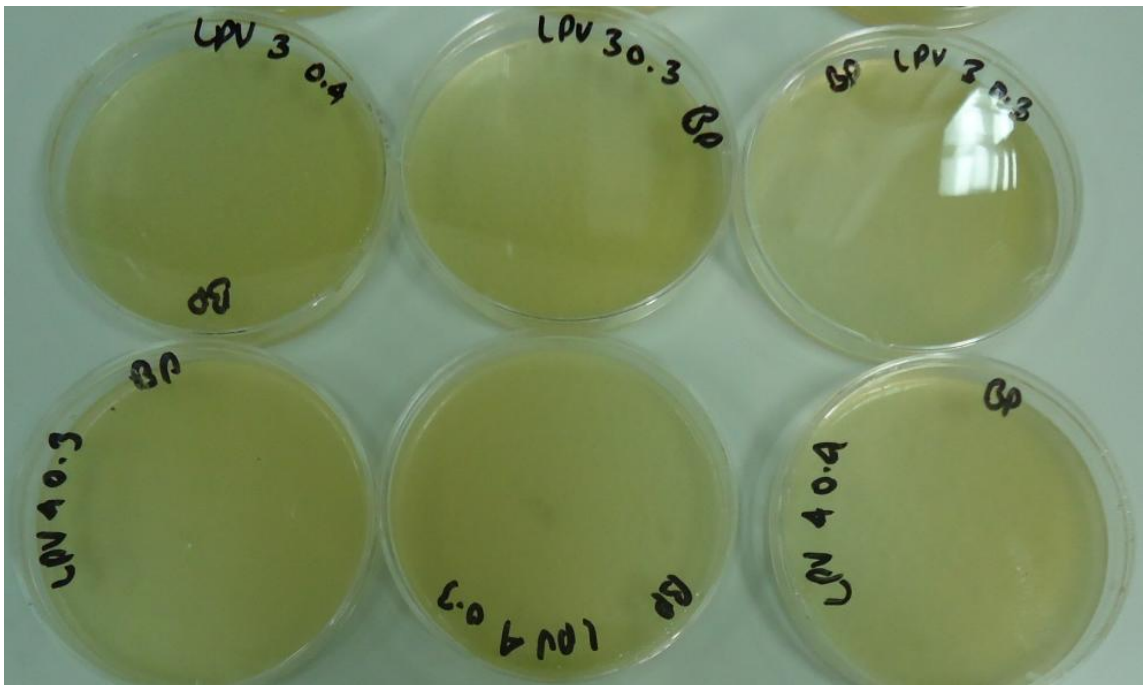


Figura N°46 Aislamiento y cuantificación de *Staphylococcus aureus*

Anexo N° 15

Tabla de límites máximos permitidos de *Staphylococcus aureus* en leche fluida pasteurizada.

1.0 Grupo de Alimento: Leche y productos lácteos. Incluye todo tipo de productos lácteos derivados de la leche de cualquier animal que suele ser ordeñado (vaca, oveja, cabra, búfala). En esta categoría, un producto simple es uno que no contiene ningún saborizante, ni contiene frutas, verduras u otros ingredientes no lácteos; tampoco se ha mezclado con otros ingredientes no lácteos, salvo lo permitido por las normas correspondientes.² Similares son productos en los cuales la grasa láctea ha sido reemplazada parcial o totalmente por grasas o aceites vegetales

1.1 Subgrupo del alimento: Leche fluida pasteurizada, con o sin saborizantes, con o sin aromatizantes

Parámetro	Categoría	Tipo de riesgo	Límite máximo permitido
<i>Escherichia coli</i>	10	A	< 3 NMP/ml
<i>Salmonella spp/25 g</i>	10		Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	7		10 ² UFC/ml
<i>Listeria monocytogenes/25 g</i>	10		Ausencia

Anexo N° 16
Evaluación de la resistencia microbiana del *Staphylococcus aureus*
por medio del método de Kirby Bahuer

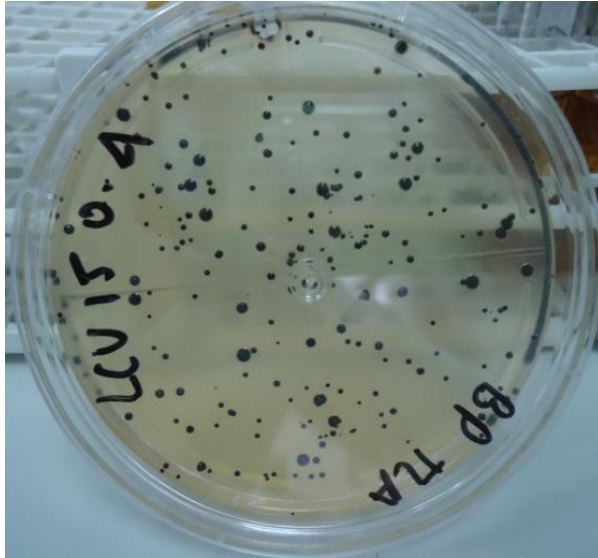


Figura N°47 Colonias de *Staphylococcus aureus* en Agar Baird Parker

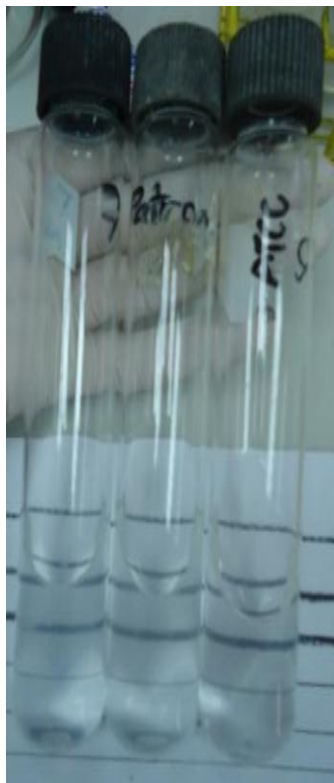


Figura N°48 Preparación de los estándares de turbidez



Figura N°49 Placa de Agar Mueller Hinton inoculada y con discos de antibiótico

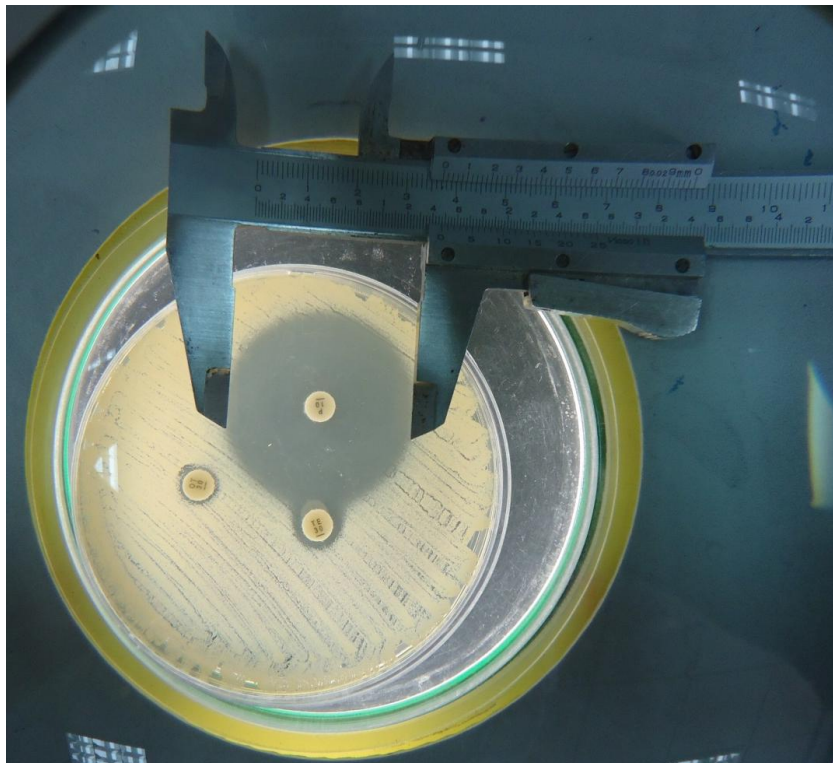


Figura N°50 Medición de halos de inhibición utilizando pie de rey

Anexo N° 17

Tabla de parámetros para la interpretación de resultados, medida de los halos de inhibición

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (μg)	Diámetro del halo de inhibición			Punto de corte Equivalente a la CMI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible
A	Penicilina ^b	10 U	≤ 14	--	≥ 15	≥ 16	≤ 8
	Ampicilina ^b	10	< 16	--	> 17	> 16	< 8
B	Vancomicina ^c	30	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 32	≤ 4
	Teicoplanina	30	< 10	11-13	> 14	> 32	< 8
C	Eritromicina	15	≤ 13	14-22	≥ 23	≥ 8	≤ 0.5
	Gentamicina ^d	120	6	7-9 ^e	≥ 10	≥ 500	≤ 500
	Estreptomicina ^d	300	6	7-9 ^e	> 10	!	!
D	Ciprofloxacino	5	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≤ 1
	Norfloxacino	10	≤ 12	13-16	≥ 17	≥ 16	≤ 4
	Nitrofurantoina	300	< 14	15-16	> 17	> 128	< 32
	Tetraciclina	30	< 14	15-18	> 19	> 16	< 4
	Fosfomicina	200	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 256	≤ 64

Anexo N°18
Comparación de la multiresistencia a los antibióticos de
***Staphylococcus aureus* cepa control ATCC 29737**



Figura N°51 Cepa ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

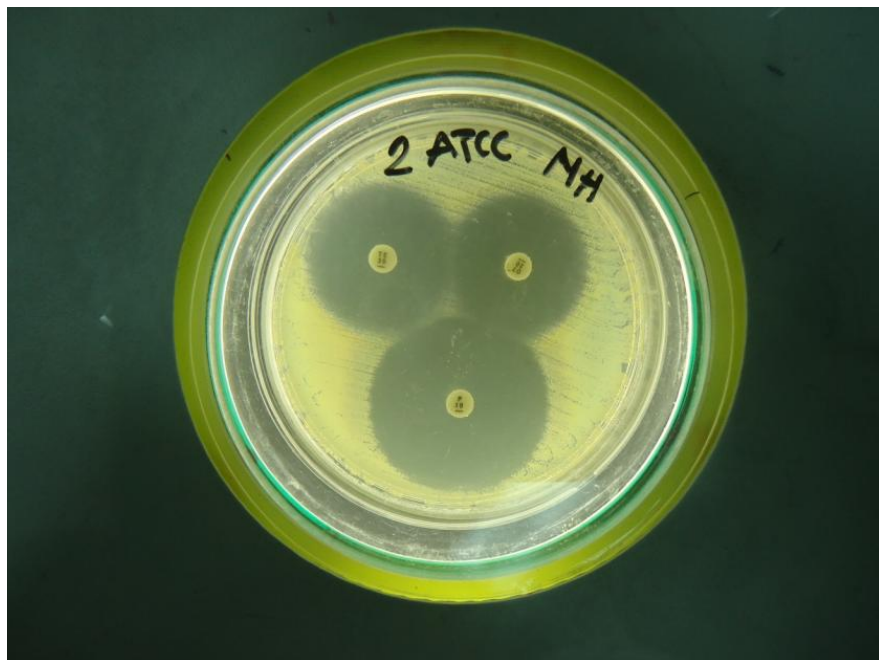


Figura N°52 Halos de cepa patrón ATCC 29737 de *Staphylococcus aureus*

Anexo N°19
Descripción del cronograma de procesamiento de muestras y sus características organolépticas.

Cronograma de procesamiento de muestras y sus características organolépticas		
Semana 1		
Preparacion de Medios de cultivo		
Semana 2		
Procesamiento de Muestras de leche cruda de vaca (Muestras del 1 al 30)		
Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>		
Numero de vacas muestreadas		5
Total de muestras	Numero de muestra de tetras afectadas	Numero de muestras de tetras No afectadas
20	1,5,9,13 y 17	2,3,4,6,7,8,10,11,12,14,15,16,18,19 y 20
Propiedades organolepticas tetras afectadas		
Leche color blanca, fluida, sin grumos, poco densa y con olor característico.		
Propiedades organolépticas teta no afectadas		
Leche color blanca, fluida, sin grumos, poco densa y con olor característico.		
Numero de vacas muestreadas		1
Total de muestras	Numero de muestra de tetras afectadas	Numero de muestras de tetras No afectadas
4	21	22,23 Y 24
Propiedades organolepticas tetras afectadas		
Leche color blanca, fluida, sin grumos, poco densa y con olor característico.		
Propiedades organolépticas teta no afectadas		
Leche color blanca, fluida, sin grumos, poco densa y con olor característico.		
Numero de vacas muestreadas		1
Total de muestras	Numero de muestra de tetras afectadas	Numero de muestras de tetras No afectadas
4	25	26,27,28
Propiedades organolepticas tetras afectadas		
Leche color blanco oscuro, tiene coágulos grandes con apariencia a leche descompuesta		
Propiedades organolépticas teta no afectadas		
Leche color blanca, fluida, sin grumos, poco densa y con olor característico.		
TOTAL DE MUESTRAS TOMADAS		TOTAL DE VACAS MUESTREADAS
28		7
TOTAL MUESTRAS DE TETAS ENFERMAS		TOTAL DE MUESTRAS DE TETAS SANAS
7		21

Semana 3		
Procesamiento de Muestras de leche cruda de vaca (Muestras del 29 a la 60)		
Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>		
Numero de vacas muestreadas		1
Total de muestras	Numero de muestra de tetas afectadas	Numero de muestras de tetras No afectadas
4	43	41,42 Y 44
Propiedades organolepticas tetas afectadas		
Leche color morado oscuro, fluida, con una película de nada encima, con olor característico.		
Propiedades organolépticas teta no afectadas		
Leche color blanca, fluida, sin grumos, poco densa y con olor característico.		
Numero de vacas muestreadas		1
Total de muestras	Numero de muestra de tetas afectadas	Numero de muestras de tetras No afectadas
4	45 y 46	49 y 50
Propiedades organolepticas tetas afectadas		
Leche color rosado-rojizo oscuro, fluida y con olor característico.		
Propiedades organolépticas teta no afectadas		
Leche color blanca, fluida, sin grumos, poco densa y con olor característico.		
Numero de vacas muestreadas		3
Total de muestras	Numero de muestra de tetas afectadas	Numero de muestras de tetras No afectadas
12	31,32,33,34,35 Y 36	37,38,51,52,53 Y 54
Propiedades organolepticas tetas afectadas		
Leche color blanco oscuro, tiene coágulos grandes con apariencia a leche descompuesta		
Propiedades organolépticas teta no afectadas		
Leche color blanca, fluida, sin grumos, poco densa y con olor característico.		
Numero de vacas muestreadas		3
Total de muestras	Numero de muestra de tetas afectadas	Numero de muestras de tetras No afectadas
12	39,40,47,48,59 Y 60	29,30,55,56,57 Y 58
Propiedades organolepticas tetas afectadas		
Leche color blanco oscuro, tiene coágulos grandes con apariencia a leche descompuesta		
Propiedades organolépticas teta no afectadas		
Leche color blanca, fluida, sin grumos, poco densa y con olor característico.		
TOTAL DE MUESTRAS TOMADAS		TOTAL DE VACAS MUESTREADAS
32		8
TOTAL MUESTRAS DE TETAS ENFERMAS		TOTAL DE MUESTRAS DE TETAS SANAS
15		17

Anexo N°20
Sensibilidad de límites detectables de antibióticos del Kit rápido
SNAP duo Beta-Tetra ST

Fármaco	MRL europeo	ST
Tetraciclina	100 ppb	35–50 ppb
Oxitetraciclina	100 ppb	35–50 ppb
Clortetraciclina	100 ppb	35–50 ppb
Penicilina G	4 ppb	3 ppb
Ampicilina	4 ppb	4 ppb
Amoxicilina	4 ppb	4 ppb
Cefapirina	60 ppb	35 ppb
Ceftiofur y metabolitos	100 ppb	50–80 ppb
Cloxacilina	30 ppb	6 ppb
Cefalonio	20 ppb	20 ppb
Cefazolina	50 ppb	40 ppb
Cefoperazona	50 ppb	35 ppb
Cefuroxima	50 ppb	15 ppb
Dicloxacilina	30 ppb	6 ppb
Nafcilina	30 ppb	4 ppb
Oxacilina	30 ppb	5 ppb

Anexo N°21
Certificado de análisis del Kit rápido SNAP duo Beta-Tetra ST



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Certificado de Análisis / Certificat de contrôle / Chargen-Prüfprotokoll

SNAP® duo Beta-Tetra ST

Product code: 99-27421

Lot number: HK984

Expiration date: 26 June 2015

Final Release Results:

Residue in Sample	Pass/Fail
Negative	Pass
Tetracycline 100 ppb	Pass
Penicillin G 4 ppb	Pass

Please contact IDEXX Technical Support at 1-207-556-4696 or email FEDtechnicalservice@idexx.com with questions.

This information is released by:

Name: *Joyce Miele, Sr. Quality Assurance Specialist*

Signature:



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Certificado de Análisis / Certificat de contrôle / Chargen-Prüfprotokoll

SNAP® duo Beta-Tetra ST

Product code: 99-27421

Lot number: LK261

Expiration date: 19 September 2015

Final Release Results:

Residue in Sample	Pass/Fail
Negative	Pass
Tetracycline 100 ppb	Pass
Penicillin G 4 ppb	Pass

Please contact IDEXX Technical Support at 1-207-556-4696 or email FEDtechnicalservice@idexx.com with questions.

This information is released by:

Name: *Joyce Miele, Sr. Quality Assurance Specialist*

Signature:

Anexo N°22
Estudios Inmunoserológicos realizados al plasma utilizado en la confirmación de colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* y cepa ATCC 29737.

REMISION N°: **2015/171911**

Fecha Emisión: 26/05/2015 09:01:35

CENTRO: UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
CODIGO: 16
Dirección: 25 AVENIDA NORTE

Tipo Hemoderivado	Cod.	Vol	Banco Sangre	Unidad	Grupo	Rh	DU	Genotipo	A.L.	F.Extrac	F. Vto.	Tipo Extracción
PLASMA	PF	40	HOSPITAL DE NIÑOS	15002875	0	+				18/05/2015	17/05/2018	SANGRE TOTAL

Total de Unidades: 1

PF PLASMA

1

Estudios Inmunoserológicos realizados a la/s unidades/es:

VDRL: NO REACTIVO HIVAG: NO REACTIVO
HBsAg: NO REACTIVO Syphi: Negativo
HCV: NO REACTIVO
CHAEI: NO REACTIVO

Estudios Inmunohematológicos realizados a la/s Unidad/es:

Anticuerpos Irregulares Realizados

[Handwritten Signature]
 María Antonia Martínez
 F. Técnica
 176

[Handwritten Signature]
 Firma Resp. Recibe