

Cartagena de Indias, 09 Febrero de 2011

Señores:  
COMITÉ EVALUADOR DE PROYECTOS  
Facultad de Ciencias e Ingeniería  
Programa de Ingeniería de Alimentos  
Ciudad

Estimados Señores:

Cumpliendo con la reglamentación de la Facultad de ciencias e Ingeniería y como requisito principal para optar al título de Ingeniero de Alimentos, presentamos a su consideración nuestro trabajo final de grado titulado "EVALUACION DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIOTICOS OXITETRACICLINA Y ERITROMICINA EN QUESOS FRESCOS COSTEÑOS DEL DEPARTAMENTO DE BOLIVAR PROVENIENTES DE LOS MUNICIPIOS ARJONA Y VILLANUEVA". Presentado por los estudiantes LUZ KARIME CORTECERO MORE y JAMENSO BENITEZ BELLIDO.

Agradeciendo la atención a la presente, nos suscribimos a ustedes.

---

LUZ KARIME COTECERO MORE  
Código: 0110510002

---

JAMENSO BENITEZ BELLIDO  
Código: 0110510034

Cartagena de Indias, 09 Febrero de 2011

Señores:  
COMITÉ EVALUADOR DE PROYECTOS  
Facultad de Ciencias e Ingeniería  
Programa de Ingeniería de Alimentos  
Ciudad

Cordial Saludo,

Me permito comunicarles que dando cumplimiento a la reglamentación de la Facultad de Ciencias e Ingeniería, manifiesto estar de acuerdo con el informe final del trabajo de grado titulado "EVALUACION DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIOTICOS OXITETRACICLINA Y ERITROMICINA EN QUESOS FRESCOS COSTEÑOS DEL DEPARTAMENTO DE BOLIVAR PROVENIENTES DE LOS MUNICIPIOS ARJONA Y VILLANUEVA". Presentado por los estudiantes LUZ KARIME CORTECERO MORE y JAMENSO BENITEZ BELLIDO.

Sin otro particular, me suscribo a ustedes.

Atentamente

---

MARLENE DURAN LENGUA  
Bacterióloga

**EVALUACIÓN DE RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS  
*Oxitetraciclina* y *Eritromicina* EN QUESOS FRESCOS COSTEÑOS DEL  
DEPARTAMENTO DE BOLIVAR PROVENIENTES DE LOS MUNICIPIOS DE  
ARJONA Y VILLANUEVA**

**LUZ KARIME CORTECERO MORÉ  
JAMENSO LUIS BENÍTEZ BELLIDO**

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
PROGRAMA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS  
CARTAGENA DE INDIAS D.T. y C**

**2011**

**EVALUACIÓN DE RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS  
*Oxitetraciclina y Eritromicina* EN QUESOS FRESCOS COSTEÑOS DEL  
DEPARTAMENTO DE BOLIVAR PROVENIENTES DE LOS MUNICIPIOS DE  
ARJONA Y VILLANUEVA**

**LUZ KARIME CORTECERO MORÉ  
JAMENSO LUIS BENÍTEZ BELLIDO**

**DIRECTOR  
MARLENE DURÁN LENGUA  
Bacterióloga  
Magíster en farmacología**

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
PROGRAMA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS  
CARTAGENA DE INDIAS D.T. y C**

**2011**

**NOTA DE ACEPTACION**

---

---

---

---

---

---

---

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

Cartagena de Indias D. T. y C., Febrero de 2011

## DEDICATORIA

Dirigido principalmente a Dios por ser quien ha estado a mi lado en todo momento dándome las fuerzas necesarias para continuar luchando día tras día y seguir adelante rompiendo todas las barreras que se me presentan.

A mi padre Jaime Benítez y a mi mama Ledis Jaramillo ya que gracias a ellos soy quien soy, son los que han velado por mi salud, mis estudios, mi educación, mis viajes y mis gustos, son a ellos a quien les debo todo, horas de consejos, de regaños y de alegrías de las cuales estoy muy seguro que las han hecho con todo el amor del mundo para formarme como un ser integral y de las cuales me siento extremadamente orgulloso. Dedicado a mis hermanos los cuales han estado a mi lado, han compartido todos esos secretos y aventuras que solo se pueden vivir entre hermanos y que han estado siempre alerta ante cualquier problema que se me puedan presentar.

También les agradezco a mis amigos más cercanos, a esos amigos que siempre me han acompañado y con los cuales he contado desde que los conocí (Dorys, Rosy, Dianis, Pato, Vivi, Lau, Vane, Mario Jose) grandes amigos; (Tato, Mane, Luzka, Cata, Jesús, Dalmis, Rondal) quien me acompañaron en toda la carrera universitaria, compartiendo grandes momentos y recuerdos y brindándome todo su apoyo, y todos aquellos a quien no menciono por lo extensa que sería la lista, pero saben que están en mi corazón !!! ^

También agradezco a todos los profesores que me apoyaron de una u otra forma entre los cuales se encuentran Marlene Duran y Bernarda Cuadrado.

*Jam Benitez*

## DEDICATORIA

A mis padres, por su apoyo incondicional, tanto en mis años de estudios en la Universidad como en toda mi vida.

A mi hermano, mis abuelos y tíos por estar siempre pendiente de mí, colaborándome en todo lo que he necesitado.

A mi novio por acompañarme y apoyarme durante los buenos y malos momentos.

Por último a mis amigos y a todas aquellas personas que de alguna forma contribuyeron a mi formación personal y profesional.

*Luz Cortecero*

## AGRADECIMIENTOS

A *Marlene Duran Lengua*, directora de la presenta investigación, por darnos la oportunidad de trabajar con ella y culminar este trabajo. Por su buena vibra y dirección, y por sus invaluable consejos, recomendación, enseñanzas, experiencias, que nos permitieron hoy alcanzar nuestros objetivos trazados.

A *German Villadiego*, quien nos apporto sus conocimientos y nos brindo toda clase de ayuda en muchas ocasiones en las prácticas de laboratorio.

A la *Universidad de Cartagena* y a todos los profesores del programa de Ingeniería de Alimentos que de una u otra forma fueron de ayuda con el aporte de sus conocimientos a nuestros estudios. A el *Laboratorio de Análisis de Alimentos*, por habernos permitido utilizar equipos y utensilios para llevar acabo esta investigación.

A la *Universidad de San buenaventura* por abrirnos sus puertas a los laboratorios de Análisis de alimentos y la colaboración de la Doctora Piedad Franco Anaya .

De igual forma le agradecemos a nuestros compañeros y amigos que de una u manera nos colaboraron, apoyaron y motivaron en todo momento de esta investigación. Los llevamos en el corazón: Mane, Tato, Cata, Jesús, Dalma, Ronald, Albertico, Alexis y Jocelyn; muchas gracias Grupo base!

Infinitas Gracias a todos

*Luz K. y Jamenso*

## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN .....	14
INTRODUCCIÓN .....	15
1 EVALUACIÓN DE RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS Oxitetraciclina y Eritromicina EN QUESOS FRESCOS COSTEÑOS DEL DEPARTAMENTO DE BOLIVAR PROVENIENTES DE LOS MUNICIPIOS DE ARJONA Y VILLANUEVA .....	17
2 MARCO TEORICO .....	18
2.1 EL QUESO .....	18
2.1.1 Consumo y producción mundial.....	18
2.1.2 Aspectos nutricionales .....	19
2.1.3 Clasificación .....	22
2.1.3.1 Queso costeño (pasta prensada).....	25
2.1.4 Materias primas .....	26
2.1.5 Procedimiento de elaboración.....	30
2.1.6 Microorganismos presentes.....	34
2.1.6.1 <i>Enterobater cloacae</i> .....	35
2.1.6.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	36
2.2 ANTIBIÓTICOS.....	38
2.2.1 Clasificación.....	38
2.2.2 Oxitetraciclina.....	40
2.2.3 Eritromicina.....	41
2.3 RESISTENCIA BACTERIANA .....	41
2.3.1 Aparición de las primeras resistencias.....	42
2.3.2 Mecanismos de resistencia.....	43
2.3.3 Transferencia de la resistencia.....	45
2.4 Antecedentes.....	46
3 JUSTIFICACIÓN.....	48

4. OBJETIVOS.....	50
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	50
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	50
5 METODOLOGIA.....	51
5.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	51
5.1.1 Diseño experimental.....	51
5.1.2 Recolección y transporte de las muestras.....	52
5.1.3 Preparación y dilución de los homogenizados.....	53
5.1.4 Evaluación de la calidad higiénica.....	54
5.1.4.1 Recuento de mesófilos aerobios.....	54
5.1.4.2 Determinación de coliformes totales.....	54
5.1.5 Identificación de cepas específicas.....	55
5.1.6 Evaluación de la resistencia.....	56
5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	57
5.3 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA.....	58
6 PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	59
6.1 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA.....	59
6.1.1 Recuento de unidades formadoras de colonia.....	59
6.1.2 Numero más probable de coliformes totales.....	65
6.2 ANALISIS DE LA EVALUACION.....	67
6.3 CEPAS IDENTIFICADAS.....	69
6.4 RESULTADO DE LA EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA.....	71
CONCLUSIONES.....	73
RECOMENDACIONES.....	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS.....	79

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo A</b> Información general de las queseras evaluadas .....	80
<b>Anexo B</b> Agua de peptona.....	81
<b>Anexo C</b> Agar Plate Count.....	82
<b>Anexo D</b> Fotos Recuento Mesófilos Aerobios.....	83
<b>Anexo E</b> Caldo Lactosado.....	84
<b>Anexo F</b> Agar EMB.....	85
<b>Anexo G</b> Sistema de Identificación BBI Crystal.....	86
<b>Anexo H</b> Fotos Identificación de Cepas .....	92
<b>Anexo I</b> Lista de Antibióticos más usados en ganado en el departamento de Bolívar.....	93
<b>Anexo J</b> Agar Mueller - Hinton .....	94
<b>Anexo K</b> Tabla de Mc Crady .....	96
<b>Anexo L</b> Norma quesos frescos.....	97
<b>Anexo M</b> Fotos locales de producción .....	98
<b>Anexo N</b> Fotos evaluación de la resistencia.....	99
<b>Anexo O</b> Informes de resultado Laboratorio control de calidad de Alimentos Universidad de San Buenaventura.....	100

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> Diagrama de Flujo del proceso de elaboración del queso costeño.....	33
<b>Figura 2</b> Esquema del diseño experimental.....	52
<b>Figura 3</b> Diagrama de Flujo de la Metodología.....	58
<b>Figura 4</b> Foto recuento en placa Quesera A.....	59
<b>Figura 5</b> Foto recuento en placa Quesera B.....	61
<b>Figura 6</b> Foto recuento en placa Quesera C.....	62
<b>Figura 7</b> Foto recuento en placa Quesera D.....	64
<b>Figura 8</b> Foto tubos confirmados con presencia de coliformes.....	66
<b>Figura 9</b> Foto Cepas puras aisladas .....	69

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1</b> Aminoácidos esenciales en la leche y la caseína.....	20
<b>Tabla 2</b> Valor nutricional de algunos alimentos por 100g de alimento.....	21
<b>Tabla 3</b> Clasificación de los quesos según la humedad en el queso sin grasa...	24
<b>Tabla 4</b> Clasificación de los principales quesos colombianos.....	25
<b>Tabla 5</b> Característica fisicoquímica del queso costeño.....	26
<b>Tabla 6</b> Tubos confirmados con presencia de coliformes. ....	66
<b>Tabla 7</b> Obtención NMP de coliformes totales/g .....	67
<b>Tabla 8</b> Carga microbiana encontrada en las muestras de queso fresco artesanal Analizadas.....	67
<b>Tabla 9</b> Valores de la media, desviación estándar y error estándar de mesófilos aerobios (UFC/g) encontrados en cada quesera .....	68
<b>Tabla 10</b> Valores de la media, desviación estándar y error estándar de coliformes totales (NMP/g) encontrados en cada quesera .....	68
<b>Tabla 11</b> Resultados de la identificación de los microorganismos .....	70
<b>Tabla 12</b> Resultados del Antibiograma .....	72

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo de investigación fue de evaluar especies de bacterias resistentes a los antibióticos Oxitetraciclina y Eritromicina en quesos frescos costeños fabricados artesanalmente en municipios Arjona y Villanueva del departamento de Bolívar. Las cepas de microorganismos fueron aisladas e identificadas empleando métodos convencionales y se confirmaron las especies entéricas mediante el sistema de identificación BBL Cristal, la susceptibilidad a Oxitetraciclina y Eritromicina se evaluó por el método de difusión en disco de Kirby Bauer.

De 8 muestras de quesos evaluados, se aislaron cepas de *Enterobacter cloacae* resistentes tanto a la oxitetraciclina como a la eritromicina y cepas de *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* de las cuales el 25% fue resistente a la tetraciclina y el 100% a la eritromicina. La presencia de cepas de la familia *Enterobacteriaceae* resistentes en quesos frescos costeños, puede significar un riesgo para salud pública ya que podría servir como fuente de diseminación de éstas y dilatar el problema de la resistencia.

## INTRODUCCION

A nivel mundial anualmente se dispone en el mercado de nuevos antimicrobianos para enfrentar el problema de la resistencia microbiana, las bacterias son capaces de desarrollar 'defensas' más efectivas contra estos nuevos y poderosos antibióticos. En este sentido, el valor terapéutico de estos antimicrobianos ha estado en evolución a través de los años. Las características mismas de los microorganismos hacen que la lucha contra ellos se haya convertido en una carrera donde ha habido la necesidad de emplear todo tipo de estrategias, desde la búsqueda de compuestos nuevos con mayor actividad biológica, hasta el diseño de moléculas nuevas mediante procedimientos de biotecnología, pasando por combinaciones de antimicrobianos [1].

La resistencia bacteriana es un tema muy importante en el estudio de los antibióticos, porque su comprobación implica el fracaso de la terapéutica. La terapia antibiótica ha conducido a una prolongación en la expectativa y calidad de vida, como parte de los avances en la medicina moderna que han reducido la morbimortalidad de numerosos padecimientos, en especial de las enfermedades infecciosas. [2].

Esto es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos tanto en el área médica como en la agricultura, y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico.[3]

El problema surge cuando las cepas aparentemente inofensivas que se

encuentran en alimentos como el queso, y que presentan resistencia a antibióticos, entran en contacto con microorganismos patógenos, ya que les pueden proporcionar dicha resistencia y el tratamiento frente a la infección no sería eficaz.

Por lo tanto es de vital importancia dar a conocer lo que se esta presentando con esta evaluación de la resistencia bacteriana a antibióticos presentes en quesos costeños del departamento de Bolívar.

**1. EVALUACIÓN DE RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS  
Oxitetraciclina y Eritromicina EN QUESOS FRESCOS COSTEÑOS DEL  
DEPARTAMENTO DE BOLIVAR PROVENIENTES DE LOS MUNICIPIOS DE  
ARJONA Y VILLANUEVA**

## **2. MARCO TEORICO**

### **2.1 EL QUESO**

El queso es una de las formas de transformación de la leche, que permite conservar su valor nutritivo y mejorar sus características organolépticas y aumentar su vida útil. El queso de acuerdo con su tipo y condiciones de almacenamiento tiene una vida útil que puede variar de pocos días a varios meses. Mediante un proceso adecuado y mediante la aplicación de unas buenas prácticas de manufactura se puede obtener un producto de excelente calidad técnica y microbiológica, altamente nutritivo e inocuo para los humanos.

Un queso fresco se puede definir como el producto obtenido de la coagulación o gelificación de la leche cuando se acidifica o se somete a la acción enzimática del cuajo, produciéndose la separación del suero y la cuajada o “sinéresis”. Está cuajada después de separada del suero, se constituye en un queso fresco. [4]

#### **3.1.1 Consumo y producción mundial**

El queso es uno de los principales productos agrícolas del mundo. Según la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) de las Naciones Unidas, en 2004 se produjeron en el mundo más de 18 millones de toneladas. Esta cantidad es superior a la producción anual de granos de café, hojas de té, granos de cacao y tabaco juntos. El mayor productor de queso es Estados Unidos, que asume un 30 por ciento de la producción mundial, seguido de Alemania y Francia. En cuanto a las exportaciones, el país con mayor valor monetario de ellas es Francia, seguido de Alemania, que es el mayor en cuanto a cantidad. De los diez

mayores países exportadores, sólo Irlanda, Nueva Zelanda, Países Bajos y Australia tienen un mercado mayoritariamente oriental, con un 95, 90, 72 y 65 por ciento de sus producciones exportadas, respectivamente. A pesar de ser Francia el mayor exportador, tan solo un 30 % de producción es exportado. Y la de los Estados Unidos, el mayor productor, es prácticamente despreciable, ya que la mayor parte de su producción es para el mercado doméstico. Los países que más queso importan son Alemania, Reino Unido e Italia, por este orden. En el consumo por persona, Grecia se encuentra en el primer puesto del ranking mundial, con 27,3 kg de media consumidos por habitante Francia es el segundo consumidor mundial, con unos 24 kg por persona, los quesos emmental y camembert son sus quesos más comunes. En tercera posición se encuentra Italia, con 22,9 kg por persona. En los Estados Unidos el consumo se está incrementando rápidamente, habiéndose triplicado prácticamente entre 1970 y 2003. El consumo por habitante alcanzó en 2003 los 14,1 kg, siendo la mozzarella el queso favorito de los estadounidenses, con un tercio del total consumido. [5]

El incremento mundial en la fabricación de queso depende no solo de la producción láctea, sino también de la habilidad en la venta de la producción, que depende de causas diversas, tales como la coyuntura económica del mercado, las variaciones en el mismo motivadas por cambios en los hábitos alimentarios, la disponibilidad de alimentos alternativos, las fluctuaciones en el poder adquisitivo y las variaciones en las tarifas aduaneras. [6]

### **2.1.2 Aspectos nutricionales**

#### **Contenido graso**

Se sabe que el queso elaborado con leche entera contiene la mayoría de los ácidos grasos esenciales como el linoléico y araquidónico, ácidos grasos que son

insaturados, que son necesarios para la dieta del los humanos y como fuente principal de energía. [7]

### **Proteínas**

El queso es una fuente adecuada de proteína porque normalmente contiene todos los aminoácidos. La caseína es la principal proteína del queso y las diferencias cuantitativas que existen entre la caseína de la leche natural y del queso se deben a las pérdidas de proteínas del suero durante el proceso de elaboración del queso.[8]

**Tabla 1.** Aminoácidos Esenciales en la leche y caseína

<b>Aminoácidos</b>	<b>Leche (%)</b>	<b>Caseína (%)</b>
Arginina	3.7	3.9
Histidina	2.2	3.0
Treonina	4.6	4.5
Valina	7.1	7.4
Leucina	12.1	10.0
Isoleucina	6.7	6.4
Lisina	7.4	8.1
Metionina	2.8	3.3
Fenilalanina	5.5	5.4
Triptófano	1.4	9.6

**Fuente:** M. Gomez, *Tecnología de Lacteos, Universidad Nacional Abierta y Distancia, 2005, p. 136*

### **Minerales, sales y vitaminas**

En el queso se establece un gran contenido de minerales y sales, dentro de los cuales se encuentran el calcio (para la formación de los huesos y dientes) el hierro

(para la formación de los glóbulos rojos de la sangre) y el fósforo (dientes y estructura ósea), como los más importantes y de mayor proporción. El queso también contiene la gran mayoría de las vitaminas esenciales, excepto la C, que se pierde durante el proceso de elaboración del queso. [9]

Finalmente se puede asegurar que el queso es un alimento con gran capacidad de conservación, con alto contenido de proteínas, grasa, calcio, fósforo, riboflavina y otras vitaminas disponibles en forma concentrada, lo cual es una ventaja sobre la leche que por su gran contenido de agua resulta un producto bastante perecedero. Es importante tener en cuenta que durante el proceso, la lactosa y algunas proteínas del suero (lactoalbúmina y lactoglobulina) se desnaturalizan pero a pesar de esto el queso se puede considerar, un buen sustituto de otros alimentos con relación al contenido de proteína

**Tabla 2.** Valor nutricional de algunos alimentos por 100g de alimento

Alimento (g)	Proteína(g)	Grasa(g)	Calcio(mg)	Hierro(mg)	Tiamina(mg)	Riboflavina(mg)	Acido Ascórbico(mg)	Energía(Kcal)
Cuajada	15.6	18.9	490	1.5	0.02	0.46	0	256
Queso blando	15.0	7.0	350	0.5	0.02	0.30	0	145
Queso Semiblando	21.7	19.0	690	0.7	0.02	0.40	0	280
Queso Duro	25.0	31.0	800	0.8	0.04	0.50	0	387
Leche de Vaca	3.4	3.3	120	0.2	0.04	0.18	2	60
Kumis	3.5	2.5	106	0.1	0.03	0.17	1	76
Yogurt	2.9	2.9	111	0.3	0.04	0.20	3	94
Carne de res magra	21.5	6.5	6	2.7	0.08	0.23	0	150
Carne de cerdo magra	18.5	11.9	5	2.0	0.71	0.25	0	186
Pollo	20.2	10.2	14	1.5	0.08	0.16	0	178
Alverja verde	8.2	0.3	36	2.4	0.36	0.12	20	116
Frijol rojo	20.4	1.2	100	7.1	0.43	0.12	3	302

**Fuente:** M. Gomez, *Tecnología de Lacteos, Universidad Nacional Abierta y Distancia, 2005, p. 136*

### 2.1.3 Clasificación

Mediante la elaboración del queso se logra conservar dos componentes no solubles de la leche, la caseína y la grasa. El proceso básico para la obtención del queso es la coagulación de la leche, luego el desuerado por el cual el lactosuero, se separa de la cuajada. En el lactosuero está la mayor porción del agua y de los componentes solubles de la leche, pasando una cantidad insignificante en la cuajada. El queso puede ser fermentado o no fermentado, y su mínima fermentación se debe a la fermentación láctica.

En el mercado existe una gran variedad de tipos de queso que difieren en por varios aspectos, entre los cuales los más importantes son: composición y naturaleza de la leche; cambios en el proceso de elaboración, que dan lugar a quesos con diferente estructura o textura y tipo de fermentación obteniéndose diferentes tipos de queso, según la actividad de los microorganismos que actúa en la fermentación de la caseína, la grasa y la lactosa presente en la cuajada. [10]

Cada tipo de queso tiene características específicas debido a diferentes factores, relacionados unos con otros, entre los cuales se pueden mencionar:

- **Factores microbiológicos**, que tienen que ver con la composición de la microflora original, asociada y las que se desarrollan durante el proceso.
- **Factores bioquímicos**, debido al contenido y características de las enzimas que actúan en el producto, como las del cuajo (coagulante) y de las bacterias, levaduras, hongos o mohos.
- **Factores físicos y fisicoquímicos**, como: temperatura, pH, potencial redox y procesos osmóticos

- **Factores químicos**, como la cantidad de calcio retenido en la cuajada, del agua de la sal y de los compuestos provenientes del atmósfera como humedad y gas carbónico.
- **Factores mecánicos, como:** el corte, agitación, trituración y frotamiento que acentúan o disminuyen los factores anteriores.[11]

Teniendo en cuenta lo anterior existen diferentes formas de clasificar los quesos, relacionadas principalmente con la composición del producto, su tecnología y maduración siendo una de las más comunes la clasificación de los quesos en: frescos y madurados y dentro de esta clasificación existen otras diferencias que tienen que ver con el desuerado espontáneo o acelerado, corte de la cuajada, presión durante el prensado, contenido de mohos y características de la corteza.

La Federación Internacional de la Lechería FIL - IDF en documento 141 de 1981 contempla los siguientes criterios para la clasificación de los quesos:

- **La materia prima:** leche de vaca, búfalo, oveja o cabra
- **Consistencia:** pasta dura, blanda, semi- blanda, queso fresco o cuajada ácida.
- **Aspecto interior:** con o sin ojos
- **Aspecto exterior:** corteza dura, seca, blanda- seca, sin corteza
- **Contenido máximo de humedad:** en el queso completo (% de humedad) y en el queso sin grasa (% H/QD).
- **Contenido de materia grasa en materia seca (%MG/MS):**También, la FAO/OMS, en su informe de junio de 1978 presenta una clasificación de los quesos según la humedad en el queso desgrasado (%H/QD) y el contenido de materia grasa en la materia seca ( % MG /MS). [12]

**Tabla 3.** Clasificación de los quesos según la humedad en el queso sin grasa

<b>%H/QD</b>	<b>CLASE</b>
Menor que 51	Extraduro
49 – 56	Duro
54 –63	Semiduro
61-69	Semiblando
Mayo que 67	Blando

**Fuente:** *Universidad Nacional de Colombia. ICTA. Guía para producir quesos colombianos.*

Por otra parte los quesos son clasificados de acuerdo al tratamiento de la cuajada en: quesos de pasta cruda, semicocida y cocida, según el calentamiento al que ha sido sometido. Quesos con pasta molida, amasada y prensada, según el tratamiento mecánico efectuado en el proceso. Quesos de pasta hilada, que consiste en el estiramiento con calor de la cuajada hasta obtener una consistencia elástica, parcialmente desmineralizada, con una estructura en forma de capas, como consecuencia del “proceso de hilado”

Por lo anterior es recomendable combinar todos los aspectos mencionados para la clasificación de los quesos para describir un determinado tipo de queso.

Existe una clasificación típica para los quesos que se elaboran actualmente en Colombia, la cual se presenta en la siguiente tabla [13]

**Tabla 4** Clasificación de los principales quesos colombianos

Nombre del queso	Tipo de maduración y de pasta	Humedad máxima (%)	Humedad en queso sin grasa máxima (%)	Consistencia	Materia grasa en materia seca mínimo (%)	Contenido Graso
MADURADOS						
PAIPA	Pasta amasada y prensada	48	60	Semiduro	40	Medio
FRESCOS NO ACIDOS						
CUAJADA	Pasta no prensada	59	72	Blando	44	Medio
QUESITO	Pasta molida	58	72	Blando	52	Alto
CAMPE SINO	Pasta no prensada	55	70	Blando	49	Alto
	Pasta prensada	50	65	Semiblando	45	Alto
MOLIDO	Pasta molida	57	71	Blando	49	Alto
AMASA DO	Pasta amasada	55	70	Blando	50	Alto
FRESCOS ACIDOS						
DOBLE CREMA	Pasta hilada	50	65	Semiblando	45	Alto
QUESILLO	Pasta hilada	50	66	Semiblando	50	Alto
PERA	Pasta hilada	49	63	Semiblando	45	Alto

**Fuente:** Universidad Nacional de Colombia. ICTA. Guía para producir quesos colombianos.

### 2.1.3.1 Queso costeño

#### Descripción general

Es un producto autóctono de la costa atlántica, como aprovechamiento de la leche que se produce en la región y para una mayor conservación. Es un producto de alto contenido de sal y muy bajo porcentaje de humedad, y ello hace que su conservación sea mayor que la de otros tipos de quesos.

La zona de mayor producción se encuentra en los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar, Atlántico, Magdalena y Cesar y en algunas regiones cálidas como el Meta. Este queso es de tipo fresco, no ácido, prensado con alto contenido en sal, no madurado y elaborado con leche de vaca. Tiene un 65% de humedad y 45% de materia grasa en materia seca. Se clasifica en un queso semi-duro, con

alto contenido en materia grasa. [14]

**Tabla 5.** Característica fisicoquímica del queso costeño

<b>Características</b>	<b>Valores de referencia</b>
Humedad (%)	45 – 47
Materia grasa (%)	23 – 25
Proteína (%)	19 – 20
Sal (%)	30 – 35
Materia grasa en materia seca (%)	44 – 46
Humedad del queso desgrasado (%)	60 -62
pH	5.0 – 5.2

**Fuente:** *Universidad Nacional de Colombia. ICTA. Guía para producir quesos colombianos.*

#### **2.1.4 Materias primas**

La materia principal para la elaboración del queso es la leche proveniente de diferentes mamíferos como la vaca, cabra, oveja y búfala, pero la más importante por su composición química, física, y nutricional, es la leche de vaca, aunque actualmente ha aumentado el procesamiento de la leche de cabra y de búfala para la elaboración de queso principalmente.[15]

#### **Leche**

La leche es un líquido complejo en donde sus diferentes componentes se encuentran en estado de dispersión, de los cuales dependen sus propiedades y efectos causados por la interacción que existe entre estos.

Es importante resaltar que la elaboración del queso no depende únicamente de la composición macro de la leche con respecto a la materia grasa, la proteína, la lactosa y las cenizas, sino también de la microestructura de los componentes

individuales es decir de los ácidos grasos, la caseína, las albúminas, las globulinas entre otros. [16]

La materia grasa de la leche se encuentra dispersa en forma de glóbulos esféricos conformando una emulsión de materia grasa en forma globular. En la materia grasa de la leche se encuentran diferentes lípidos como los neutros, los polares las sustancias insaponificables como el colesterol el dehidrocolesterol, precursor de la vitamina D, los carotenoides principalmente la vitamina A. La agregación de la grasa a la cuajada, está relacionada con la grasa de la leche, pero también con la composición de la grasa y de su membrana que la rodea. La composición de la grasa afecta su punto de fusión y durante el proceso se libera grasa líquida en el manejo de la cuajada, ocurriendo que los glóbulos grasos grandes fundidos internamente, sean expulsados de la cuajada con mayor facilidad que los pequeños. [17]

En la leche las proteínas tienen una estructura específica, que se afecta por la acción de diferentes tratamientos particularmente, por la acción de los ácidos y por el calentamiento, ocurriendo la desnaturalización que ocasiona cambios en su estructura secundaria y terciaria, presentándose la reagrupación de sus moléculas y como consecuencia una disminución de la solubilidad y de su actividad. Sin embargo este efecto no sucede con las caseínas.[18]

El carbohidrato de mayor importancia de la leche es la lactosa, es mucho menos dulce que otros azúcares comunes como la glucosa y sacarosa, siendo su poder edulcorante seis veces menor que el de la sacarosa. Además su dulzura en la leche se enmascara por la caseína. La gran mayoría de los microorganismos que se encuentran en la leche, metabolizan la lactosa ocurriendo una de las fermentaciones más importantes tecnológicamente como es la producción de ácido láctico. La lactosa que contiene la cuajada desuerada, dependerá de varios factores como: técnica de elaboración y del contenido de humedad. En un medio húmedo, como el de la cuajada, la lactosa se transforma en ácido láctico por

acción de las bacterias lácticas principalmente en los quesos frescos no madurados, ocasionando un sabor y aroma característico y una textura especial como consecuencia de la disolución de los minerales ligados a la caseína.[19]

Las sales de la leche son importantes tanto desde el punto de vista nutricional, como que son responsables en gran parte del estado fisicoquímico del suero de la leche, por lo que influye en la estabilidad de la proteína. Las sales son muy importantes en la elaboración del queso especialmente las sales de calcio, magnesio y de los ácidos cítricos y fosfórico. Las enzimas que se encuentran en la leche provienen de tres fuentes importantes:

- a. Las que contiene la leche en el tiempo de secreción.
- b. Las de los microorganismos en el momento de su obtención (en el momento del ordeño)
- c. Las de los microorganismos que contaminan la leche durante su producción.

Las principales enzimas que se encuentran en la leche normalmente son: lactoperoxidasa, ribonucleasa, la xantina-oxidasa, la catalasa, la aldolasa, la lactasa y grupos de fosfatasas, lipasas, esterases, proteasas, amilasas, oxidasas y reductasas.[20]

Las vitaminas en el queso, además de aportar al valor nutricional de la leche, influyen significativamente en la acción metabólica de los microorganismos en el queso. Entre las vitaminas que contiene la leche las que desempeñan un papel importante en la elaboración del queso están la vitamina A y las del complejo B, la más resistente a los tratamientos es la vitamina A por ser insoluble en agua las del complejo B son solubles y bastantes lábiles por lo tanto, se reducen con los tratamientos pero quedan algunos residuos importantes, en cambio la vitamina C, se pierde gran cantidad en los tratamientos térmicos de los quesos frescos y en los quesos madurados se pierde del todo. Muchas de las vitaminas son

importantes para el desarrollo de los microorganismos sin embargo algunos microorganismos la pueden sintetizar durante su proceso metabólico. [21]

## **Sal**

La adición de sal en la elaboración del queso tiene como función principal su conservación puesto que inhibe el desarrollo de las bacterias contaminantes, pero además tiene una gran influencia en la formación del cuerpo del queso teniendo en cuenta los siguientes aspectos: la adición de sal en el suero produce una mayor cantidad de agua en el queso ya que el intercambio de los iones de calcio de la caseína por los iones de sodio es mayor, ocasionado un queso más suave y flexible porque los iones de sodio aumentan la absorción del agua. Pero, cuando se adiciona cantidades excesivas de sal ocurre el caso contrario, se disminuye la absorción del agua y da como resultado un queso con textura quebradiza. [22]

## **Cultivo láctico y Acidificación**

En la elaboración de quesos es de primordial importancia la acidificación de la leche a partir de las bacterias lácticas porque influye de manera significativa en el desuerado, en su conservación, su aroma y sabor.

El cultivo comúnmente contiene bacterias *Lactococcus Lactis*, sub-especie *Lactis* y *Lactococcus Lactis*, subespecie *Cremoris*, que son mesófilas y su crecimiento óptimo está entre 18 y 22°C. [23]

## **Enzimas Coagulantes**

La coagulación enzimática es una de las técnicas de mayor uso en la fabricación de los quesos. Para lograr dicha coagulación, tradicionalmente se ha venido utilizando el cuajo animal cuya enzima principal es la Quimosina. [24]

### **2.1.5 Procedimiento de elaboración**

Antes de la elaboración del queso como tal la leche cruda debería ser sometida a las operaciones de filtración, clarificación, enfriamiento, almacenamiento y estandarización. Al iniciar el proceso de fabricación es necesario que la leche que se agrega a la tina quesera tenga la temperatura óptima para iniciar la producción del queso. También se debe evitar la formación de espuma al realizar esta operación y para ello se adiciona la leche contra las paredes de la tina lechera. La existencia de espuma dificulta establecer con precisión el tiempo para realizar la operación del corte de la cuajada.

En la fabricación del queso, existen dos etapas fundamentales que son: la coagulación y deshidratación o desuerado. [25]

#### **Coagulación o cuajado de la leche**

Este fenómeno ocurre cuando se desequilibra la solución coloidal de la caseína produciendo la acumulación de las micelas libres y la formación de un gel en el que quedan aferrados el resto de los componentes de la leche.

Lo anterior ocurre con la adición del cuajo cuya función es precisamente la coagulación enzimática de la leche conformando la cuajada firme, la cual es posible convertirla en granos. La agitación, el calentamiento y la fermentación que ocasiona la liberación del suero (sinéresis del coágulo) y la concentración de la leche son los eventos más importantes de la producción de quesos.

En la coagulación de la leche que se prepara para la elaboración del queso se utilizan dos métodos básicos la coagulación por acidificación y la coagulación con enzimas coagulantes como el cuajo y dependiendo del método se obtienen dos tipos de cuajadas que se denominan la cuajada ácida y la cuajada enzimática

respectivamente, pero también se puede obtener un tipo de cuajada mixta por la combinación de los métodos. [26]

### **Corte de la cuajada**

Esta operación también llamada “troceado”, consiste en cortar en porciones iguales la masa de la leche coagulada. Debido a esta acción mecánica la superficie total de exudación del suero, aumenta, agilizando el desuerado. Para la elaboración de quesos frescos y de pasta blanda, la cuajada se corta en trozos más grandes.

El tiempo de cortar la cuajada es de vital importancia, pues si la cuajada se corta cuando está demasiado blanda se produce grandes pérdidas de grasa y proteína.

Para evitar la formación del polvo o partículas muy finas de queso, suspendidas en el suero, y como consecuencia un bajo rendimiento, es necesario hacer un corte cuidadoso y uniforme. [27]

### **Agitación**

La agitación de los granos de cuajada en el lactosuero, se realiza con el propósito de evitar la sedimentación o aglomeración de la cuajada y acelerar su deshidratación, reduciéndose la sinéresis y liberando el suero de los granos de la cuajada. La agitación debe ser suave si la cuajada producida es ácida y si la cuajada es enzimática para los quesos de pasta dura entonces la agitación será más fuerte y continua. Inicialmente la agitación puede durar de 15 a 30 minutos y a mayor tiempo y temperatura la liberación del suero de los granos será mayor. De cualquier manera, la agitación debe ser suave para evitar el rompimiento de los granos de la cuajada. [28]

## **Extracción del suero**

Esta operación comienza en las etapas de calentamiento, del lavado de la cuajada y se termina antes del moldeado de la cuajada. Algunas veces se realiza un pre-prensado, que consiste, en presionar la cuajada dentro del suero con el objetivo de compactar más los granos de la cuajada y evitar la inclusión de burbujas de aire entre ellos, ocasionando un cambio en la textura interna del queso, donde aparece ojos de forma irregular.[29]

## **Salado**

Es una etapa importante en la elaboración del queso ya que cumple con las siguientes funciones: proporcionar el flavor, mejorar su consistencia, prolongar su período de conservación y formar la corteza durante su maduración.

Inmersión del queso en salmuera (solución saturada de NaCl), hasta obtener una absorción adecuada de sal; esta inmersión se realiza de diferentes maneras, para el queso costeño picado, una vez el queso esté completamente desuerado, se sumerge en la salmuera saturada antes o después del prensado, durante un tiempo que puede ser desde unos minutos a unas horas. [30]

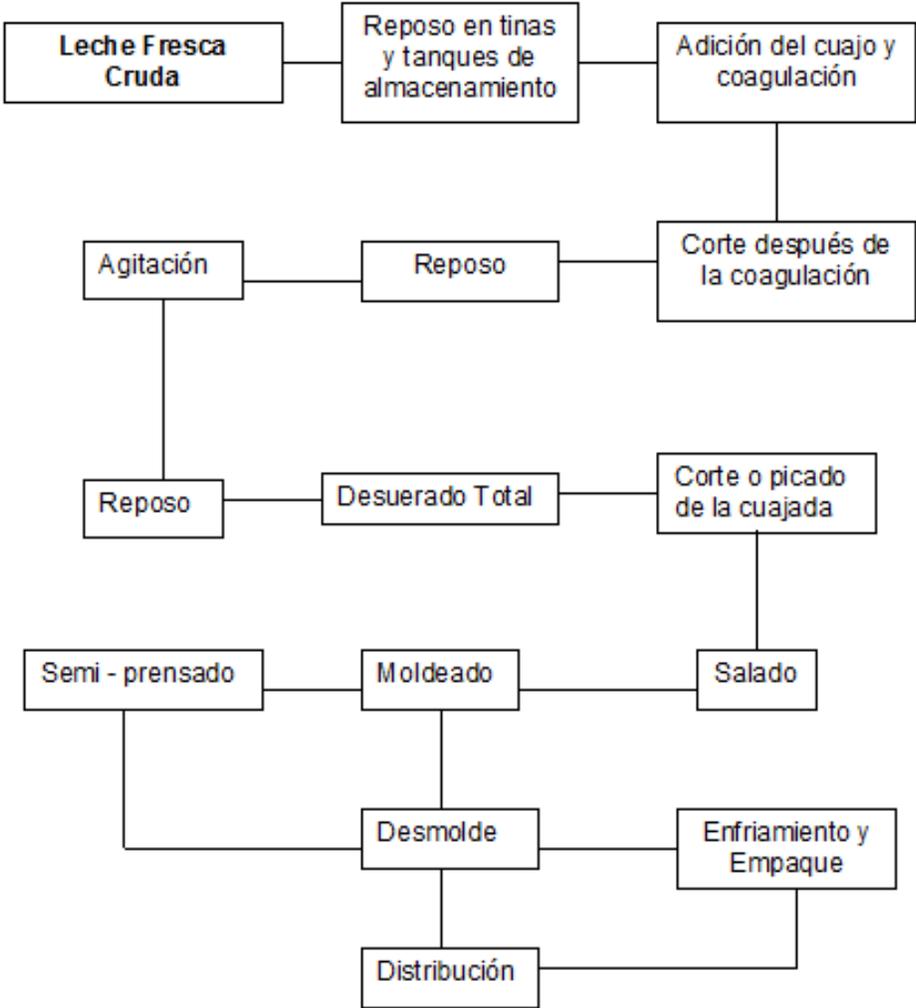
## **Moldeado y prensado**

Para transformar la cuajada en una masa fácil de manipular, con el tamaño y la consistencia requeridos además de lograr que el queso tenga una superficie lisa y cerrada es necesario someter la cuajada a la operación de moldeado. En el caso de obtener quesos duros y para algunos semiduros entonces además del moldeado se someten a la operación de prensado. [31]

Para que pueda ocurrir un buen moldeado, es necesario que los granos de la cuajada se deformen y fusione. Esta deformación debe ser viscosa, lo que

significa que la masa de la cuajada debe conservar su forma una vez se suspenda la fuerza externa. A mayor fuerza mayor velocidad de deformación y mayor facilidad en el prensado. [32]

**Figura 1.** Diagrama de Flujo del proceso de elaboración del queso costeño



Fuente: Benitez, Cortecero, 2011

### 2.1.6 Microorganismos presentes

La flora microbiana inicial de queso proviene de la leche cruda. Durante el ordeño fenómenos hormonales junto a la presión que se aplica sobre el pezón fuerza a la leche a pasar a través del orificio del mismo, el cual puede ser una puerta de entrada de microorganismos al interior del pezón. La microbiota habitual de la ubre incluye estreptococos, estafilococos y micrococos, seguidos de *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli* y otros. [33]

Situaciones anormales debidas a infecciones, enfermedades o hábitos de ordeño deficientes pueden afectar a la microbiota de la leche recién ordeñada. Las vacas con mastitis, una enfermedad inflamatoria del tejido mamario, pueden ocasionar la llegada de un elevado número de microorganismos y células somáticas a la leche. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Strep. dysgalactiae* y *Strep. uberis*, *E. coli* y *Actinomyces pyogenes* son los microorganismos más frecuentemente implicados en las mastitis aunque también se han caracterizado otros, como *Listeria monocytogenes*, *Staph. epidermidis*, coliformes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium bovis*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Br. melitensis*, *Br. suis*, *L. monocytogenes*, salmonelas, y *Coxiella burnetii*. [34]

Otros microorganismos patógenos que pueden encontrarse en la leche proceden mas bien de contaminaciones fecales que de secreciones a través de la glandula mamaria. Entre estos se encuentran *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* y *E. coli*.

Los materiales que normalmente se encuentran en el entorno del animal pasan, en mayor o menor extensión a la superficie de la ubre, pezones y piel de la vaca. Numerosos microorganismos de diversos tipos acompañan a este tipo de material. Miembros del género *Bacillus* procedentes del suelo, clostridios del alimento asilado, enterobacterias del estiércol así como otros microorganismos alcanzan la

leche recién ordeñada. [35]

El aire entorno al lugar de ordeño no contribuye de forma importante al contenido microbiano total de la leche, mas importante que el numero es el tipo de bacterias que llega a la leche procedente del aire. Los microorganismos que habitualmente se encuentran en el aire son micrococos y esporas de *Bacillus* y *Clostridium* spp. [36]

Las aguas de suministro de la granja contienen, con frecuencia coliformes y microorganismos psicotróficos. [37]

El personal que manipula la leche y el equipo puede aportar diversos tipos de microorganismos, incluyendo patógenos. Los micrococos y estafilococos de la piel y de las fosas nasales pueden pasar a la leche sobre todo durante el ordeño.

El único tratamiento al que es sometida la leche cruda antes de comenzar el proceso de fabricación del queso es la filtración, así eliminan, al menos, partículas macroscópicas fecales o procedentes del suelo. Sin embargo, no mejora la calidad higiénica de la leche e incluso podría originar un incremento del contenido microbiano de la leche debido a contaminaciones cruzadas a través del mismo filtro. [38]

#### **2.1.6.1 *Enterobacter cloacae***

Es una bacteria que pertenece al género *Enterobacter*, de la familia de las *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo Gram negativo Oxidasa negativo y Catalasa positivo presente en el aparato digestivo humano.

*Enterobacter cloacae* son bacterias Gram negativos lo que significa que contienen dos paredes celulares.. Este organismo es un fermentador de la glucosa y es capaz de crecer en ambientes aeróbicos y anaeróbicos. *Enterobacter cloacae* es positivo para el beta-galactosidasa, dihidrolasa arginina, ornitina ecarboxylase, la utilización de citrato, reducción de nitratos, y la reacción de Voges-Proskauer. Aunque el ácido es producido a partir de muchas fuentes de carbono, esta

bacteria no produce lisina decarboxilasa, sulfuro de hidrógeno, la ureasa, triptófano desaminasa, e indol. [39]

*Enterobacter cloacae* se puede encontrar en la piel y tejidos humanos, así como frutas, verduras, y de dispositivos tales como un tanque de tratamiento de agua caliente. A pesar de este organismo es principalmente un patógeno y causa enfermedad en humanos, *Enterobacter cloacae* se han utilizado como control biológico de enfermedades de las plantas, tales como la pudrición de la semilla en oomiceto *Pythium ultimum* y se utiliza para controlar las plagas de insectos en las hoja. [40]

*Enterobacter cloacae* son patógenos nosocomiales que pueden ser adquiridos a través de la piel, el tracto gastrointestinal, el tracto urinario o derivado del exterior debido a la naturaleza en todas partes. Este organismo es un patógeno oportunista, lo que significa que la enfermedad objetivos pacientes comprometidos, como los jóvenes, viejos, o los que tienen una enfermedad grave como el virus de la inmunodeficiencia humana. Las infecciones nosocomiales más frecuentes de este organismo, lo que significa que pueden ser contratados a partir del resultado de la hospitalización, tales como la UCI. *Enterobacter cloacae* se han aislado de las manos del personal, endoscopios, productos de la sangre, aparatos para la presión intra-arterial, estetoscopios, los termómetros, digitales y muchos más. [41]

#### **2.1.6.2 *Klebsiella pneumoniae***

Es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, compuesto por bacterias Gram negativas de la familia *Enterobacteriaceae*, que desempeñan un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas. [42]

Una característica morfológica importante en *Klebsiella* es la presencia de cápsula, la cual le confiere la propiedad de producir colonias muy mucosas. Los factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae* son fimbrias, y en algunas cepas la capacidad de producir una enterotoxina. Sin embargo, las especies de *Klebsiella* son consideradas de baja virulencia.

*Klebsiella pneumoniae* es un patógeno muy común que se encuentra por muchos proveedores de cuidado de salud. Además de ser un patógeno nosocomial que causa varias infecciones tales como infecciones del tracto urinario, neumonía nosocomial y las infecciones intraabdominales, *pneumoniae* ha sido identificado como una infección adquirida en la comunidad con la fluctuación de la prevalencia. correlación fuerte se ha establecido entre la distribución geográfica y demográfica entre la población mundial y los incidentes de infecciones adquiridas en la comunidad causada por el Sr. *K. pneumoniae*. *K. pneumoniae* ha sido considerado un patógeno respiratorio que causa *Pneumoniae*, el symptoms incluyen: presentación tóxicos con inicio súbito, fiebre alta, y hemoptisis. [43]

En los bovinos la *Klebsiella* es una de las causantes de la diarrea del ternero y de la mastitis coliforme. Se multiplican rápidamente en los cuartos de la ubre, pudiendo ocasionar mastitis gangrenosa y en algunos casos la muerte. Se presenta fiebre, cesa la secreción láctea, hay anorexia, depresión y pérdida de peso. Se recomienda en este caso el tratamiento sistémico con sulfametazina o combinación de antibióticos como penicilina y estreptomina, oxitetraciclina o ampicilina. Se debe aplicar un tratamiento local, intramamario, con vaciado frecuente de la tetilla [44]

## 2.2 ANTIBIOTICOS

Los antibióticos son compuestos relativamente sencillos, producidos por bacterias u hongos que atacan específicamente a las bacterias. Interfieren en algún paso del metabolismo donde encuentran un blanco adecuado. Desde el descubrimiento de la penicilina, se han descubierto una docena de nuevos tipos de antibióticos y optimizado o sintetizado cerca de una centena. Sin embargo, su eficacia se ha visto alterada por su uso excesivo o incorrecto, que conduce a la aparición y diseminación de bacterias resistentes. [45]

### 2.2.1 Clasificación

Según su espectro de acción se clasifican en:

- Antibióticos de amplio espectro: tiene actividad frente a un gran número de gérmenes, tanto Gram (+) como Gram (-) y además las chlamydias, rickettsias o legionellas.
- Antibióticos de espectro intermedio: actúan frente a un número limitado de bacterias.
- Antibióticos de espectro reducido: son útiles frente a un número muy pequeño de microorganismos. Generalmente son útiles frente a los gram (+), también hay los que son útiles solo frente a los gram (-), pero generalmente tiene un espectro un poco más amplio. [46]

El concepto de espectro es importante porque, ante una patología causada por una infección bacteriana se debe utilizar un antibiótico eficaz y del menor espectro posible, para prevenir la aparición de resistencias.

Según su mecanismo de acción se clasifican en:

- Compuestos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana, por ejemplo las penicilinas, las cefalosporinas, las cicloserinas, la vancomicina, la bacitracina y el imidazol.
- Compuestos que actúan de modo indirecto en la membrana celular de los microorganismos y que afectan su permeabilidad y permite la fuga de compuestos intracelulares. Comprenden la poloximina, la colistimetato y los antibióticos poliénicos (nistatina y anfotericina B).
- Medicamentos que afectan la función de las subunidades ribosómicas 30S y 50S y que causan inhibición reversible de la síntesis proteica. Estos bacteriostáticos abarcan: Clorafenicol, tetraciclinas, eritromicinas y clindamicina.
- Compuestos que se unen a la subunidad 30S del ribosoma y alteran la síntesis de proteínas, lo cual acaba con la muerte del microorganismo. Los aminoglucósidos actúan de esta manera.
- Medicamentos que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos, como las rifamicinas (rifampicinas) que bloquean a los ARN polimerasa dependiente de ADN, y las quinolonas que inhiben la girasa.
- Antimetabolitos como el trimetoprina y las sulfonamidas, que bloquean fases metabólicas específicas que son esenciales para los microorganismos.
- Análogos de ácidos nucleicos como zidovudina, ganciclovir, vidarabina y aciclovir, que impiden la replicación viral

Por lo tanto, unos antibióticos son bactericidas, eliminan la bacteria, y otros son bacteriostáticos, impiden su crecimiento y/o reproducción. [47]

### **2.2.2 Oxitetraciclina**

Se obtiene del *Streptomyces rimosus*. Son antibióticos bacteriostáticos policíclicos pertenecientes al grupo de las tetraciclinas, aunque a altas dosis pueden ser bactericidas para algunos gérmenes.

Su mecanismo de acción radica en la inhibición de la síntesis de proteínas en las bacterias, porque se ligan a una subunidad ribosomal e impiden la llegada del aminoacil ARNt al sitio aceptor.[48]

Tienen un espectro antimicrobiano muy amplio que cubre bacterias Gram (+) y Gram (-), aunque son más eficaces ante las Gram (+). También son activas frente a micoplasma, Chlamydias y Rickettsia.

Las enfermedades más comunes donde se utilizan las tetraciclinas incluyen el cólera, infecciones por Chlamydias como es la uretritis y el linfogranuloma venéreo, infecciones por Rickettsias que producen el tifus o fiebre Q, neumonía por micoplasma, en la brucelosis, en el acné grave, en la erradicación de meningococos, y también en la prevención de diarrea del viajero producidas por cepas enterotóxicas de *E. coli*.

Ocurre cuando una bacteria obtiene un plásmido que codifica un sistema de flujo activo inducible. Este sistema no acepta la entrada de las tetraciclinas. En vez de ello, estas se transportan en forma normal, pero la bacteria las expulsa con rapidez. En las bacterias entéricas se distinguen 5 genes que dan lugar a este proceso. Aunque la resistencia general de las tetraciclinas flujo mediado por plásmidos, algunas cepas presentan una reducción en el transporte de tetraciclinas que se debe a una mutación de un gen cromosómico. [49]

### **2.2.3 Eritromicina**

Son antibióticos seguros, producidos por una cepa de *Streptomyces erythreus*,

son primariamente bacteriostáticos, son moléculas cíclicas de gran tamaño que contiene un anillo de lactona. Inhiben la síntesis de proteínas al fijarse a la subunidad 50S de los ribosomas y bloquean la fase de translocación.

Son de carácter básico, espectro medio y actúan a nivel ribosómico impidiendo la síntesis de proteínas bacterianas. Pertenece al grupo de los macrólidos, y de estos es el más utilizado. Es activa frente a gram + aunque hay algunos gram – que son también sensibles como la *Neisseria gonorrhoeae* y *Bordetella pertussis* y también es activa frente a *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila*.

Las bacterias resisten la acción de estos macrólidos por dos mecanismos. Primero, muchas de ellas experimentan una mutación en el gen cromosómico que codifica la proteína L4 o L12 en el fragmento ribosómico 50S. Segundo, algunas bacterias llevan un factor R que codifica una enzima que dimetila el rRNA 23S en el fragmento ribosómico 50S. Como resultado de cualquiera de estos mecanismos, el fragmento 50S no reconoce con avidéz el antibiótico. Cuando el mecanismo se debe a un factor R, la bacteria es resistente a todos los macrólidos.[50]

### **2.3 RESISTENCIA BACTERIANA**

Hay grupos bacterianos que no son afectados por un antibiótico, bien porque carecen del sitio de acción del antibiótico o porque es inaccesible. Esta situación se define diciendo que la bacteria es insensible o presenta resistencia natural. Todos los aislamientos de esta bacteria son resistentes a ese antibiótico de forma constante. Otras especies son susceptibles al antibiótico, pero esto no impide que, por diferentes razones, se aislen ocasionalmente variantes que no lo son y que crecen normalmente en presencia del antibiótico. En este caso se habla de resistencia adquirida. [51]

Los primeros casos de resistencia se detectaron poco tiempo después de iniciarse el empleo de antibióticos. Su aparición es una consecuencia de la capacidad de las bacterias, como todos los seres vivos, de evolucionar y adaptarse al medio en que habitan. Desde la aparición de las primeras cepas resistentes, la introducción de nuevos antibióticos es correspondida por la aparición de bacterias capaces de resistir a ese antibiótico. La aparición de cepas resistentes puede ocurrir localmente en una determinada especie y en una situación geográfica. Sin embargo, la capacidad bacteriana para compartir su información genética acaba diseminando la resistencia a otros géneros y la movilidad actual de la población se encarga de diseminar por el planeta las cepas resistentes. La principal causa de este problema ha sido el abuso de los antibióticos en la práctica médica y en otros sectores, como la ganadería, donde los antibióticos se han usado de forma masiva como aditivo en los piensos. [52]

### **2.3.1 Aparición de las primeras resistencias**

Luego del descubrimiento de los antibióticos, se dio paso a la utilización de estos en medicina veterinaria, comenzaron a ser utilizados para tratamientos de animales enfermos. Esto comenzó en la década de los 50.

En esa época, al alimentar a un cerdo con desechos de fermentación de tetraciclinas, se descubrió que esos cerdos crecían más que los que recibían otros alimentos. Al asociarse la respuesta lograda con el origen del alimento, se estaba descubriendo la capacidad de los antibióticos de contribuir al crecimiento de los animales, mejorando los índices de conversión, esto es, crecer más con la misma cantidad de alimentos, esto es el inicio historio del uso de antibióticos como promotores del crecimiento cuando son adicionados en cantidades subterapéuticas a los alimentos. Los grupos de antibiótico que en general se utilizaban para este fin eran penicilina y tetraciclinas. Algunos años más tarde comenzó a surgir preocupación por la aparición de cepas resistentes a estos

antibióticos de salmonella aisladas de terneros con enfermedad respiratoria. Sin embargo la utilización de quimioterápicos como promotores de crecimiento, ha continuado hasta nuestros días, con “buenos resultados”. Después del descubrimiento de los primeros antibióticos, se dio la necesidad de la búsqueda de nuevas drogas; esta búsqueda era impulsada por la inquietud de los investigadores, por una parte, pero innegablemente, la aparición de diversos niveles de resistencia bacterianas por el otro. Esto generó una competencia entre los microorganismos (generando resistencia y seleccionándose en pro de estas) y el hombre, imaginando, diseñando, tamizando, en la búsqueda de nuevos compuestos más eficaces y más seguros para la lucha antimicrobiana. [53]

### **2.3.2 Mecanismos de resistencia**

Las bacterias tienen una capacidad de división muy eficiente: dependiendo de las condiciones y del medio pueden dividirse en 20 min o hasta cada 100 días y más. En los procesos infecciosos, las bacterias se encuentran en activa división y se pueden contar hasta  $10^9$ /ml. Estas dos condiciones hacen que se encuentren en el mejor escenario para que los mecanismos de variación genética operen eficientemente. Mutaciones en el genoma del huésped o en algún elemento asociado (plásmido, profago, etc.) eliminan la capacidad de transportar al antibiótico, destruyen o modifican al antibiótico, lo expulsan de la célula, o bien modifican al blanco. En cuanto a la posibilidad de transferir esta nueva capacidad, disponen de varios mecanismos entre los cuales los más conocidos son:

- La conjugación entre microorganismos emparentados o no, donde la presencia de plásmidos conjugativos promiscuos portadores de resistencias es un buen aliado
- La transducción mediada por bacteriófagos
- La transformación donde la simple lisis libera el ADN que será captado por una

bacteria receptora sin demasiadas restricciones, al menos a este nivel.

El fenómeno de resistencia tiene un sustrato genético intrínseco o adquirido que se expresa fenotípicamente por mecanismos bioquímicos. De esta manera puede observarse la resistencia desde el ambiente biológico y otro el bioquímico.

Se conoce como resistencia natural a los mecanismos permanentes determinados genéticamente, no correlacionables con el incremento de dosis del antibiótico.

La resistencia adquirida aparece por cambios puntuales en el DNA (mutación) o por la adquisición de éste (plásmidos, trasposones, integrones).

En el primero se dan casos tales como la transformación de una Betalactamasa en una Betalactamasa de espectro extendido o como en el caso de mutaciones de los genes que codifican las porinas con el consecuente bloqueo del ingreso del antibiótico al interior del microorganismo.

Existen otras denominaciones de resistencia como son:

- Resistencia relativa o intermedia: ocurre un incremento gradual de la MIC (concentración inhibitoria mínima) a través del tiempo. Para obtener un efecto terapéutico es necesario alcanzar niveles séricos y tisulares adecuados. La susceptibilidad o resistencia del germen es en este caso dependiente de concentración.
- Resistencia absoluta: sucede un incremento súbito en la MIC de un cultivo durante o después de la terapia. Es inefectivo el incremento de la dosis clínica usual.
- Seudoresistencia: ocurre una resistencia in vitro pero una gran efectividad in vivo.

Se denomina tolerancia antibiótica al fenómeno en el cual la diferencia entre la

MBC (concentración bactericida mínima) y la MIC es muy grande lo cual ocurre con relaciones MBC/MIC mayores de 8 lo que permite la persistencia del microorganismo. [54]

### **2.3.3 Transferencia de la resistencia**

Muchas bacterias se convierten en resistentes por la adquisición de genes procedentes de plásmidos o de transposones mediante transferencia horizontal de genes. Sin embargo, la transferencia horizontal no explica el origen de los genes de resistencia, solo su difusión entre las bacterias.

Los genes que codifican resistencia a antibióticos fluyen desde y hacia bacterias Gram positivas y Gram negativas y bacterias que habitan nichos extremadamente diferentes. Las transferencias horizontales, entre géneros bacterianos diferentes, son, lamentablemente, frecuentes. [55]

Los mecanismos de transferencia de resistencia pueden clasificarse en:

**Plásmidos:** Son porciones circulares de ADN extracromosómico que puede estar codificado para resistencia a un determinado antibiótico. Cuando codifican resistencias se los denomina plasmados R. Los plasmados son autorreplicantes, independientemente del ADN cromosómico. En general codifican características que mejoran los rasgos de supervivencias de las bacterias, sin ser imprescindibles para la misma. Pueden ser transferibles entre bacterias del mismo, o diferentes géneros. La adquisición de resistencia por parte de la bacteria resectora, por lo tanto, es en un paso. un plásmido puede ser incorporado por un virus y transferido a otra bacteria. En general se cita como ejemplos a las bacteriófagos. También puede pasar de una célula a otra por conjugación.

**Transposones:** son los ya clásicamente conocidos como genes saltarines. Son cadenas cortas de ADN que saltan de cromosomas de plásmido, en uno u otro

sentido, entre plásmidos o entre plásmidos y bacteriófagos. La característica más saliente de este tipo de material es la de integrarse con facilidad a cadenas de ADN diferente del original. A diferencia de los plásmidos, los genes saltarines no son autoreplicantes, deben mantenerse dentro de una estructura autoreplicante para replicarse. Un rasgo central y peligroso de los transposones es la posibilidad de que varios de ellos, codificando resistencias a múltiples drogas, estén incluidos dentro de un mismo plásmido, que lo permite por transferencia de este último la adquisición de multiresistencia por parte de la bacteria receptora.

Integrones y casetes genéticos: diferentes de los transposones, pero de mecanismos algo parecido. Se recombina en un sitio específico y codifican resistencia a un solo antibiótico. Junto con los transposones, son los sistemas que más actúan en la adquisición de resistencia por parte de los plásmidos. Constan de tres regiones, dos invariables y una central variable, que es la que porta el casete. El denominado casete es un elemento que incluye un gene y un sitio recombinante. Se han identificado más de 40 casetes y la mayoría porta genes de resistencia. [56]

## **2.4 ANTECEDENTES**

Druvic Lemus Espinoza, María Teresa Maniscalchi Badaoui, Mazn Hassoun, Heycarid Vizcaya (2008). Aislaron cepas de *Staphylococcus* presentes en quesos fabricados artesanalmente. La susceptibilidad a oxacilina y la determinaron por el método de difusión en disco y detectaron la presencia del gen *mecA*, por prueba de látex MRSA Slidex (BioMérieux). De las muestras de queso que evaluaron, aislaron 171 cepas estafilocócicas, 26 (15,2%) resistentes a oxacilina,. Detectaron la presencia del gen que codifica la proteína PBP2 (una transpeptidasa con baja afinidad por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos) tanto en cepas con homoresistencia a oxacilina. Concluyeron que la resistencia de los *Staphylococcus* a la oxacilina

mediada por el gen *mecA* estaba presente en cepas ambientales de fácil intercambio entre individuos. Demostraron que no existe relación estadísticamente significativa entre el tipo de resistencia a oxacilina y la presencia de la proteína PBP2; la resistencia de algunas cepas de *Staphylococcus spp.* a la oxacilina se asoció con resistencia simultánea a eritromicina, gentamicina, ciprofloxacina, clindamicina y tetraciclina.

María López, Carmen Lozano, Virginia Pérez, Santiago Martínez, Rosa del Campo, Fernanda Ruiz-Larrea, Myriam Zarazaga, Carmen Torres. Detectaron con un estudio realizado en la Universidad La Rioja de España, la presencia de *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina y *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina en alimentos de origen animal (ave, ternera, cordero y cerdo). Demostraron que la presencia de *Enterococcus* y *Staphylococcus* resistentes, en la microbiota de alimentos tiene una implicación epidemiológica en la diseminación de la resistencia y que la cadena alimentaria debe ser considerada como un reservorio y vehículo de transmisión de este tipo de resistencia.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El uso de antibióticos en animales que luego se convierten alimentos puede afectar la salud humana por la presencia de residuos de droga y en particular por la selección de bacterias resistentes en animales. Las consecuencias de tal selección incluyen:

- Un incremento en el riesgo de transmisión de patógenos resistentes al hombre por contacto directo con los animales o por el consumo de agua o alimentos contaminados.
- La transferencia de genes resistentes de los animales a la flora bacteriana humana.

Cada vez más, los datos sugieren que el inadecuado uso de antibióticos plantea un riesgo emergente de salud pública.

Los factores asociados con la aparición de resistencia a antibióticos en los animales parecen ser similares a los responsables de esa resistencia en seres humanos. La comprensión y formación inadecuada de las directrices sobre el uso apropiado y los efectos de un uso inadecuado de antibióticos en la resistencia es muy común entre los agricultores, veterinarios y dispensadores. [57]

El desarrollo de este proyecto de investigación contribuye al conocimiento científico del país, impulsando a investigar y a buscar posibles soluciones a este problema causante de riesgos emergentes de salud pública.

El impacto ambiental en esta investigación se ve reflejado en la salud de los consumidores, muchas personas mueren a causa de infecciones ocasionadas por

microorganismos resistentes a antibióticos lo cual es imposible de controlar a este problema emergente.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la presencia de bacterias resistentes a antibióticos *Oxitetraciclina* y *Eritromicina* en quesos frescos costeños del departamento de Bolívar provenientes de los municipios de Arjona y Villanueva.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Aislar e identificar las bacterias presentes en el queso elaborados en Arjona y Villanueva.
- Evaluar el espectro de resistencia a los antibióticos en estudio a las cepas identificadas en los quesos.
- Evaluar el perfil de resistencia presente en cada uno de los municipios mencionados.

## **5. METODOLOGIA**

Este estudio es de tipo descriptivo prospectivo, cuya característica principal se basa en la presentación de los hechos ligados a su esencia real, todo estudio prospectivo lleva a la exploración de posibilidades futuras basadas en indicios.

En esta investigación se evaluó la presencia y ausencia de microorganismos resistentes a los antibióticos oxitetraciclina y eritromicina, en las muestras de quesos frescos tomadas en las queseras (A, B, C y D) de los municipios de Arjona y Villanueva, en el mes de Enero de 2011, con el fin de saber si esta es otra fuente de transferencia de resistencia a la población que consume este tipo de alimentos (Ver Anexo A).

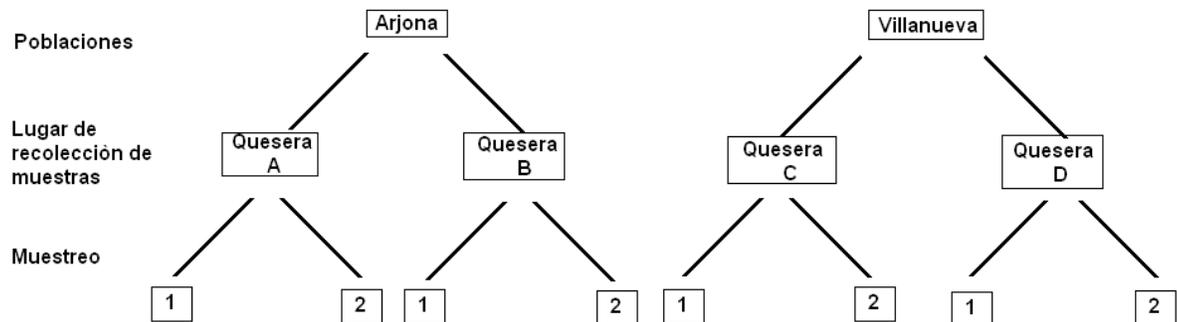
### **5.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

#### **5.1.1 Diseño experimental**

Para la evaluación de la presencia de resistencia bacteriana a los antibióticos oxitetraciclina y eritromicina en quesos costeños producidos artesanalmente en los municipios de Arjona y Villanueva en el departamento de Bolívar realizamos un diseño experimental aleatorio, de 2x2x2. Mediante screening se escogieron las poblaciones más cercanas a la ciudad de Cartagena que más queso producen y que distribuyen el producto a mayor número de municipios; así mismo se escogió de cada población las dos queseras mas grandes y se hizo dos muestreos, el primero fue realizado el día 10 del mes de Enero de 2011 y el segundo el día 24 del mismo mes. Las variables de respuesta son: Recuento de Mesofilos aerobios,

determinación de coliformes totales y evaluación de la resistencia en los microorganismos aislados.

**Figura 2.** Esquema del diseño experimental



**Fuente:** Benitez, Cortecero, 2011

### 5.1.2 Recolección y transporte de muestras

La recolección de los quesos se realizó de una manera prospectiva se tomaron en la medida en que estos fueron producidos, por lo que fue necesario almacenarlas, para su respectivo análisis. El universo corresponde a todos los quesos frescos costeños, producidos artesanalmente en los municipios de Arjona y Villanueva, en el departamento de Bolívar. Se trabajo con una muestra de 8 quesos frescos, considerada como representativa para la realización del presente estudio.

Se tomaron 250 g de queso y se depositaron en bolsas debidamente identificadas, con número de la muestra y la quesera correspondiente. Las bolsas fueron transportadas en neveras de icopor con hielo en el lapso máximo de 2 horas, hasta el laboratorio de microbiología ubicado en el Centro Regional de Educación

Superior a Distancia CREAD, de la Universidad de Cartagena, donde permanecieron refrigeradas de 1 a 5 °C.

### **5.1.3 Preparación y dilución de los homogenizados**

El procedimiento empleado para el aislamiento y recuento de los microorganismos presentes en la muestras consistió en preparar una suspensión homogénea de alimento que permitió la preparación de las diluciones utilizadas en el método de recuento correspondiente.

Se utilizaron los siguientes equipos y materiales para la realizar este procedimiento: mechero, mortero, balanza, refrigerador, pipetas, frascos de diluciones, tubos de ensayos y gradilla. El medio de cultivo empleado fue agua peptonada al 0.02 % (Ver Anexo B)

Primero se desinfecto con alcohol la parte de la bolsa por donde se extrajo la muestra, ya que debía ser extraída de forma aséptica. Después se procedió a preparar las diluciones consecutivas de la muestra, ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , etc.); para esto el queso fue macerado en un mortero adecuadamente esterilizado y se pesó 25 g representativos de la muestra total, en un frasco de dilución con 225 ml de agua peptonada, para obtener una dilución  $10^{-1}$ . Posteriormente se agito vigorosamente el frasco, y se dejo en reposo durante 10 minutos.

Para preparar la dilución  $10^{-2}$ , se arrastro 1 ml de la dilución  $10^{-1}$ , con pipeta de 1 ml a un tubo de dilución que contenia 9 ml de agua peptonada y se agito cuidadosamente. Subsiguientemente se preparo la dilución  $10^{-3}$ , arrastrando 1 ml de la dilución  $10^{-2}$ , a un tubo de dilución que contenía 9 ml de agua peptonada y se agito cuidadosamente.

## **5.1.4 Evaluación de la calidad higiénica**

### **5.1.4.1 Recuento estándar en placa de mesófilos aerobios**

Para determinar el número de células viables o de unidades formadoras de colonias, utilizamos el método de recuento en placa (SPC), ya que es el indicador más amplio incluyendo todos los géneros aerobios y facultativos que crecen en medios simples a una temperatura de 20 y 45 °C.

Para realizar este procedimiento necesitamos los siguientes equipos y materiales: incubadora, baño de maría, refrigerador, contador de colonia, cajas de Petri estériles, pipetas de 1 ml estéril; y como medio de cultivo empleamos agar Plate Count (agar peptona de caseína glucosa extracto de levadura).(Ver Anexo C)

Inicialmente se transfirió por duplicado, alícuotas de cada una de las diluciones consecutivas obtenidas previamente, en cajas de Petri esterilizadas con autoclave, donde se vertió aproximadamente 15 ml de agar Plate Count fundido y mantenido a 45 °C. Inmediatamente se mezcló el inóculo con el medio de cultivo fundido. Una vez solidificado el medio de cultivo, se invirtieron las placas y se incubaron a 35 °C  $\pm$  2°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se realizó el conteo de colonias. (Ver Anexo D)

### **5.1.4.2 Determinación de coliformes totales**

La determinación de coliformes en las muestras es un signo de mala calidad higiénica del proceso, falta de higiene de los manipuladores, recontaminación después del proceso o de contaminación fecal. Esta determinación es sumamente crítica, ya que estos son los mismos organismos encontrados en el tracto intestinal humano.

Los equipos y materiales que utilizamos son: incubadora, pipetas, asa de inoculación, gradillas, cajas de Petri, tubo de ensayo, tubos de fermentación. Los medios de cultivo: caldo lactosado(Ver Anexo E) y agar EMB (Ver Anexo F).

Preliminarmente efectuamos una prueba presuntiva, que consistió en verter 1ml de cada una de las diluciones del homogenizado, en tubos con caldo lactosado, utilizando tres tubos por cada dilución; estos tubos se agitaron suavemente y se incubaron a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24-48 horas.

Pasadas las 48 horas se anotaron los tubos que mostraron producción de gas, observando el desplazamiento dentro del tubo de Durham.

Se confirmaron que los tubos con producción de gas en el caldo lactosado de la prueba presuntiva, son positivos a organismos de grupo coliforme, sembrando por estría una asada de cada uno de los tubos en la superficie de una placa de agar EMB. Estas placas se incubaron invertidas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Pasado este tiempo se hizo la lectura de las colonias típicas de coliforme. Se anotaron el número de tubos confirmados como positivos para organismos coliformes en cada dilución y se calculo el NMP.

### **5.1.5 Identificación de cepas específicas**

Para la identificación de las cepas encontradas en las muestras de queso empleamos el sistema de identificación BBL Crystal (ID) (Ver Anexo G) de bacterias entericas/no fermentadoras, ya que sirve para la identificación de bacterias aerobias gram negativas que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae así como también los bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores de glucosa encontrados frecuentemente en este tipo de alimentos.

El sistema BBL Crystal es un método miniaturizado de identificación. El kit está compuesto de las etapas del panel BBL Crystal, las bases BBL Crystal y los tubos de fluido de inóculo para organismos entericos/heces BBL Crystal. La tapa contiene 30 sustratos deshidratados en las puntas de los dientes. La base tiene 30 posillos de reacción (los sustratos bioquímicos y enzimáticos se describen en el Anexo G. Para preparar el inóculo del análisis, debimos obtener cultivos puros, aislando colonias específicas de la prueba confirmativa de coliformes totales realizada en agar EMB. Se aislaron 5 colonias presuntamente diferentes. Se tomó una colonia grande bien aislada con un asa estéril y se suspendió en el tubo de fluido del inóculo con  $2,2 \pm 1$  mL de fluido (8,5 g de NaCl, 0,8372 g de ácido 3-morfolinpropanosulfónico y agua purificada hasta 1000mL); luego se tapó el tubo y se agitó durante 15 s. Se repitió el mismo procedimiento con las 4 colonias restantes. Estos inóculos se utilizaron para llenar los 30 posillos de la base. Al alinear la tapa con la base y cerrarla en su lugar, el inóculo del análisis rehidrató los sustratos secos e inició las reacciones del análisis. Posteriormente se incubaron los paneles invertidos durante 24 horas, a  $36^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y se examinaron los posillos para observar los cambios de color producidos como resultado de las actividades metabólicas de los microorganismos. Se registraron las reacciones para su posterior interpretación. (Ver Anexo H)

#### **5.1.6 Evaluación de la resistencia**

Los antibióticos empleados en la evaluación de la resistencia: Oxitetraciclina y Eritromicina, fueron escogidos por ser los más comúnmente utilizados en el tratamiento de infecciones en ganado y en humanos (Ver Anexo I). Para la evaluación de la resistencia se utilizó el método de difusión en disco de Kirby Bauer. Para ejecutar este método, previamente se preparó el patrón de turbidez llamado estándar de Mac Farland; se ajustó la densidad del inóculo con una suspensión de sulfato de Bario como estándar (0,5 de la escala de Mac Farland).

El estándar de Mac Farland de 0,5 tiene una turbidez comparable a una suspensión bacteriana que contiene  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml.

Este estándar se obtuvo agregando 0,5 ml de  $\text{BaCl}_2$  0,048 M a 99,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Luego se distribuyó de 4 a 6 ml de esta solución dentro de tubos similares a los que serían usados para la preparación del inóculo, inmediatamente después se sellaron y guardaron a temperatura ambiente. Para comprobar que no se presentó evaporación los tubos se marcaron a la altura del menisco.

Para la preparación del inóculo se tomaron 4 o 5 colonias bien aisladas y de igual morfología, seguidamente se realizó una suspensión en 4 o 5 ml de caldo tripteína de soya tocando la parte superior de cada colonia con el asa. Después el caldo se incubó a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  hasta que alcanzó la turbidez del 0.5 de la escala de Mac Farland estándar.

Una vez obtenido el inóculo estándar de cada una de las 5 cepas identificadas, se sembró masivamente cada uno en una caja de petri con agar Mueller-Hinton (Ver Anexo J). A continuación se comprimieron sobre la superficie del agar los sensibilizadores de los antibióticos, dispuestos de tal manera que los halos de inhibición no se unieran. Luego se incubaron las placas invertidas a  $35^\circ\text{C}$  por 24 h. Las bacterias crecieron como pasto sobre la superficie del agar, pero se observan zonas circulares entorno a cada disco de antibiótico que inhibió el crecimiento bacteriano. Luego se midió el diámetro de la zona de inhibición con una regla graduada en milímetros y se comparó con el patrón de sensibilidad. Las bacterias se clasificaron como sensibles o resistentes a cada antibiótico.

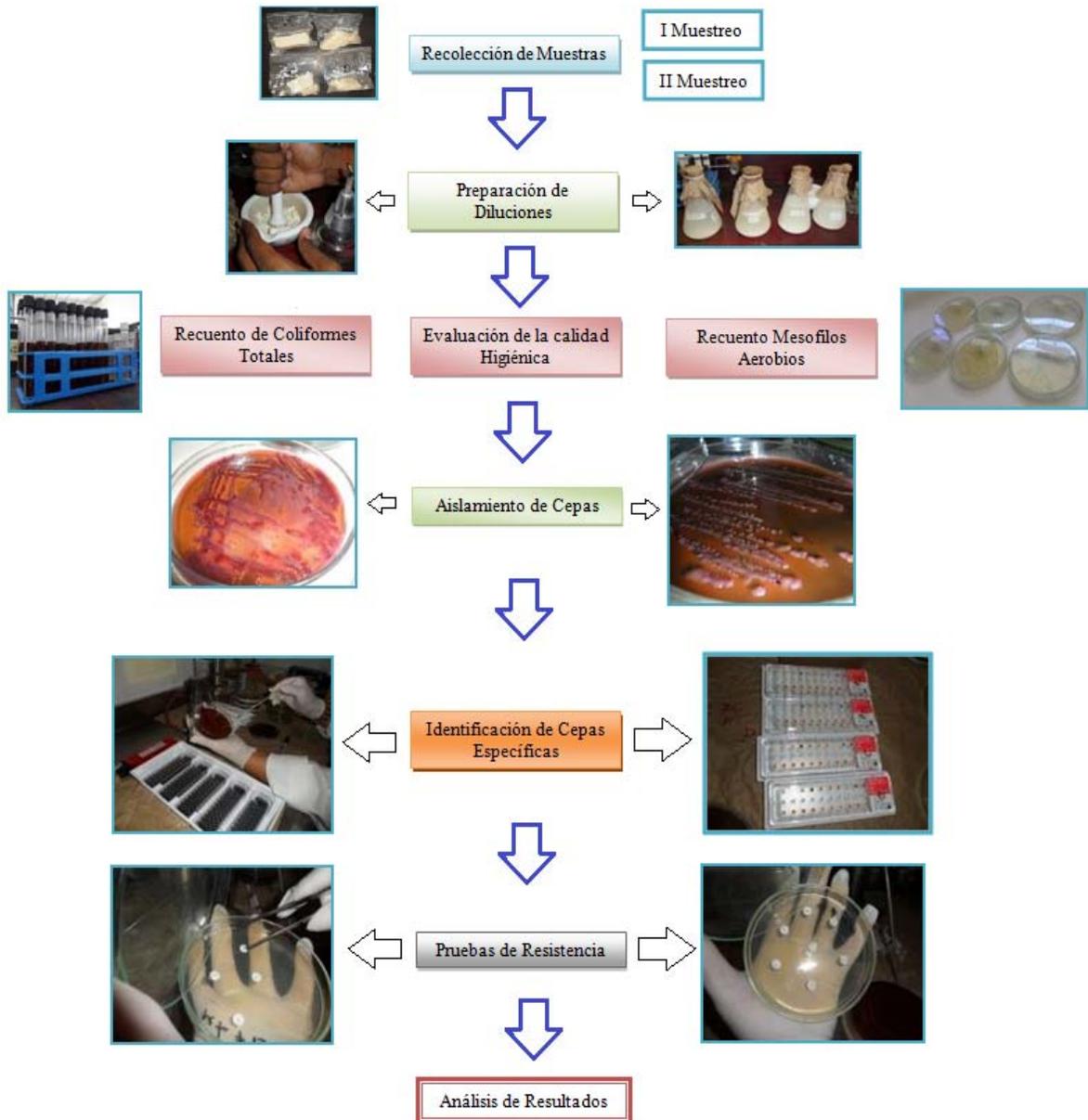
## **5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), donde los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar y el análisis descriptivo se realizó mediante el programa GraphPad InStat 3 para Windows 7. La

comparación entre grupos se realizó mediante el método de Tukey, para una  $P < 0,05$ .

### 5.3 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGIA

Figura 3. Diagrama de Flujo de la Metodología



Fuente: Benitez, Cortecero, 2011

## 6. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 6.1 CÁLCULOS

#### 6.1.1 Recuento estándar en placa estimado

Debido a que todas las placas presentaron más de 300 colonias, dividimos las dos placas correspondientes a la dilución más elevada, en 8 secciones radiales y contamos todas las colonias que se encontraron en una sección. Multiplicamos el total de colonias obtenidas por 8 con el fin de conseguir una estimación del número total de colonias presentes en la placa. Luego hallamos la media del valor estimado por las dos placas y multiplicamos por el factor de dilución correspondiente. El valor obtenido se da como el recuento estándar en placa estimado.

### QUESERA A

**Figura 4.** Foto recuento en placa Quesera A



*Fuente: Benitez, Cortecero, 2011*

**Muestra 1:**

Placa 1 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 97

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $97 \times 8 = 776$

Placa 2 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 69

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $69 \times 8 = 552$

Media del valor estimado de las dos placas  $= \frac{776+552}{2} = 664$

Recuento estándar en placa estimado de mesófilos aerobios

$= 664 \times 10^3 = 664000 = 66 \times 10^4$  UFC/g

**Muestra 2:**

Placa 1 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 175

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $175 \times 8 = 1400$

Placa 2 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 105

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $105 \times 8 = 840$

Media del valor estimado de las dos placas  $= \frac{1400+840}{2} = 1120$

Recuento estándar en placa estimado de mesófilos aerobios

$$= 1120 \times 10^3 = 1120000 = 11 \times 10^5 \text{ UFC/g}$$

## QUESERA B

**Figura 5.** Foto recuento en placa Quesera B



*Fuente: Benitez, Cortecero, 2011*

### Muestra 1:

Placa 1 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 93

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $93 \times 8 = 744$

Placa 2 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 75

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $75 \times 8 = 600$

Media del valor estimado de las dos placas =  $\frac{744+600}{2} = 672$

Recuento estándar en placa estimado de mesófilos aerobios

$$= 672 \times 10^3 = 672000 = 67 \times 10^4 \text{ UFC/g}$$

### Muestra 2:

Placa 1 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 71

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $71 \times 8 = 568$

Placa 2 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 81

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $81 \times 8 = 648$

Media del valor estimado de las dos placas =  $\frac{568+648}{2} = 608$

Recuento estándar en placa estimado de mesófilos aerobios

$$= 608 \times 10^3 = 608000 = 61 \times 10^4 \text{ UFC/g}$$

### QUESERA C

**Figura 6.** Foto recuento en placa Quesera C



*Fuente: Benitez, Cortecero, 2011*

**Muestra 1:**

Placa 1 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 47

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $47 \times 8 = 376$

Placa 2 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 69

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $69 \times 8 = 552$

Media del valor estimado de las dos placas  $= \frac{376+552}{2} = 464$

Recuento estándar en placa estimado de mesófilos aerobios

$= 464 \times 10^3 = 464000 = 46 \times 10^4$  UFC/g

**Muestra 2:**

Placa 1 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 132

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $132 \times 8 = 1056$

Placa 2 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 54

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $54 \times 8 = 432$

Media del valor estimado de las dos placas  $= \frac{1056 + 432}{2} = 744$

Recuento estándar en placa estimado de mesófilos aerobios

$$= 744 \times 10^3 = 744000 = 74 \times 10^4 \text{ UFC/g}$$

## QUESERA D

**Figura 7.** Foto recuento en placa Quesera D



*Fuente: Benitez, Cortecero, 2011*

### Muestra 1:

Placa 1 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 46

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $46 \times 8 = 368$

Placa 2 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 128

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $128 \times 8 = 1024$

Media del valor estimado de las dos placas  $= \frac{368 + 1024}{2} = 696$

Recuento estándar en placa estimado de mesófilos aerobios

$$= 696 \times 10^3 = 696000 = 70 \times 10^4 \text{ UFC/g}$$

### **Muestra 2:**

Placa 1 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 193

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $193 \times 8 = 1544$

Placa 2 con dilución  $10^{-3}$

Colonias contadas en una sección = 177

Número estimado del total de colonias presentes en la placa =  $177 \times 8 = 1416$

Media del valor estimado de las dos placas =  $\frac{1544 + 1416}{2} = 1480$

Recuento estándar en placa estimado de mesófilos aerobios

$$= 1480 \times 10^3 = 1480000 = 15 \times 10^5 \text{ UFC/g}$$

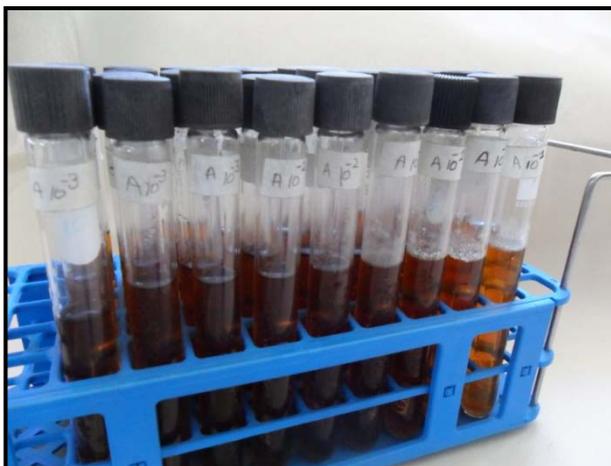
### **6.1.2 Numero mas Probable de Coliformes totales**

Luego de la confirmación de la presencia de coliformes en los tubos de caldo lactosado que se presentaron con producción de gas y turbidez, con la siembra en cajas con medio EMB, arrojaron los siguientes datos:

Signo (+): indicando que el tubo es positivo, hubo crecimiento de coliformes

Signo (-): indicando que el tubo es negativo, no hubo crecimiento de coliformes

**Figura 8.** Foto tubos confirmados con presencia de coliformes



*Fuente: Benitez, Cortecero*

**Tabla 6.** Tubos confirmados con presencia de coliformes.

Quesera A						Quesera B						Quesera C						Quesera D					
Muestras																							
1			2			1			2			1			2			1			2		
Diluciones			Diluciones			Diluciones			Diluciones			Diluciones			Diluciones			Diluciones			Diluciones		
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-

*Fuente: BENITEZ, CORTECERO 2011*

La obtención del NMP se realizó de la siguiente forma: según lo observado, (tubos con presencia de coliformes), se busco en la tabla de McCrady (Ver Anexo K) y se anoto el NMP que correspondía al número de tubos positivos de cada dilución. Los valores obtenidos de la tabla se multiplicaron por 10 para obtener el NMP/g.

**Tabla 7.** Obtención NMP de coliformes totales/g

Tubos confirmados con presencia de coliformes				Factor correspondiente en Tabla de McCrady	NMP/g
Dilución	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>		
Quesera A	3	2	0	90	900
	3	2	0	90	900
Quesera B	3	2	0	90	900
	3	1	0	40	400
Quesera C	3	0	0	23	230
	3	1	0	40	400
Quesera D	3	1	0	40	400
	3	1	0	40	400

*Fuente:* Benitez, Cortecero, 2011

## 6.2 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA

Se evaluó si los valores obtenidos de coliformes totales y mesófilos aerobios se encontraban dentro de los límites permitidos para quesos frescos.

En la Tabla 8. Se encuentran recopilados los resultados obtenidos del recuento de mesófilos aerobios y de coliformes totales en cada una de las muestras de cada quesera. Los valores de la media para cada grupo de microorganismo, así como los valores de la desviación estándar y el error estándar calculados en GraphPad InStat 3 se encuentran en las Tablas 9 y 10.

**Tabla 8.** Carga microbiana encontrada en las muestras de queso fresco artesanal analizadas

Quesera	A		B		C		D	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Recuento estándar en placa estimado de mesófilos aerobios (UFC/g)	66 x 10 <sup>4</sup>	11 x 10 <sup>5</sup>	67 x 10 <sup>4</sup>	61 x 10 <sup>4</sup>	46 x 10 <sup>4</sup>	74 x 10 <sup>4</sup>	70 x 10 <sup>4</sup>	15 x 10 <sup>5</sup>
Coliformes totales NMP/g	900	900	900	400	230	400	400	400

*Fuente:* Benitez, Cortecero, 2011

**Tabla 9.** Valores de la media, desviación estándar y error estándar de mesófilos aerobios (UFC/g) encontrados en cada quesera

Quesera	A	B	C	D
Media*	88	64	60	110
Desviación estándar	31,11	4,24	19,8	56,57
Error estándar	22,00	3,00	14,00	40,00

\* Valor multiplicado por  $10^{-4}$

*Fuente:* Benitez, Cortecero, 2011

Según el ANOVA, el valor de P obtenido fue de 0,4991, considerado estadísticamente no significativo, y asume que las muestras fueron tomadas de poblaciones con desviaciones estándar iguales. Entonces la carga de mesófilos aerobios en las muestras de los dos municipios son similares.

**Tabla 10.** Valores de la media, desviación estándar y error estándar de coliformes totales (NMP/g) encontrados en cada quesera

Quesera	A	B	C	D
Media	900	650	315	400
Desviación estándar	0,00	353,55	120,21	0,00
Error estándar	0,00	250,00	85,00	0,00

*Fuente:* Benitez, Cortecero, 2011

En el análisis estadístico de coliformes totales el ANOVA arrojó un valor de P igual a 0,1069, considerado estadísticamente no significativo. Todas las muestras se encontraban fuera de los valores límites de carga microbiana establecidos por la norma (Ver Anexo L), por lo que estos productos no estaban aptos para el consumo humano. No es de sorprender este resultado, ya que las condiciones de fabricación del queso en todos los establecimientos donde recolectamos las muestras son antihigiénicas, el lugar de fabricación no se encuentra aislado de los animales domésticos, el suelo se encuentra muy sucio, al aire libre, los contenedores de la leche son de plástico, por lo que no son lavados adecuadamente después de finalizado el proceso, por esta razón se encuentran llenos de insectos (Ver Anexo M). A todos estos factores se le suma el hecho de

que no se cumplen los tratamientos que se deben hacer a la leche antes del inicio del proceso. La leche cruda es traída desde las fincas cercanas (algunos usan cantinas de acero inoxidable, pero otros usan galones de aceite vacíos), en caballos, burros o motos, sin ningún monitoreo de temperatura. Al llegar al lugar de procesamiento, el único tratamiento que recibe la leche es la filtración, que solo sirve para eliminar contaminantes macroscópicos, y por lo que pudimos observar los paños usados para filtrar no se encontraban limpios.

Para nadie es un secreto que el personal manipulador es un punto crítico en la fabricación de cualquier tipo de alimento, en el proceso de fabricación de queso fresco costeño artesanal, por lo general una sola persona es la encargada de todo el procedimiento, esta persona no cuenta con los implementos de protección básicos (gorro, tapaboca, guantes, botas, ropa limpia y blanca, etc.), además al momento de el corte y agitación de la cuajada, lo realizan con los brazos.

Una vez obtenido el producto final, en algunos lugares lo guardaban refrigerado, hasta que los clientes lo fueran a buscar, pero los refrigeradores no se encontraban limpios. En otras queseras el queso era distribuido inmediatamente después de terminarlo, lo empacaban en bolsas de plástico, y lo transportaban sin refrigeración.

### **6.3 CEPAS IDENTIFICADAS**

Luego de la prueba confirmativa de presencia de coliformes en EMB, aislamos una colonia de cada placa, sembrando por estria en otra placa con agar EMB, con el fin de obtener cepas puras.

#### **Figura 9. Cepas puras aisladas**



**Fuente:** BENITEZ, CORTECERO 2011

Utilizamos estas cinco cepas puras para preparar el inóculo de análisis del sistema de identificación BBL Crystal. El patrón resultante de las 30 reacciones se convirtió en un número de perfil de 10 dígitos que se utilizó como base para la identificación, este patrón se encuentra en la base de datos BBL Crystal. La identificación se deriva de un análisis comparativo del patrón de reacción del aislado de análisis con aquellos que existe en la base de datos. En el anexo G se muestra una lista completa de taxones que comprenden la base de datos actual. La precisión de este sistema de identificación está basada en el uso estadístico de análisis diseñados especialmente y en una base de datos exclusiva.

**Tabla 11.** Resultados de la identificación de los microorganismos.

Código	Identificación de Microorganismo
Quesera A	<i>Enterobacter cloacae</i>
Quesera B	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>
Quesera C	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>
Quesera D	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>

**Fuente:** Laboratorio Control De Calidad De Alimentos – UNIVERSIDAD SAN BUENAVENTURA CARTAGENA 2011

Estas cepas encontradas, como hemos descrito en el marco teórico, son bacterias entéricas, provenientes del tracto intestinal de mamíferos, pero también viven en el suelo y en el agua. La contaminación con *Enterobacter cloacae* probablemente se dio al momento del ordeño, una mala higiene del lugar donde se realizó. Esta bacteria ocasiona infecciones urinarias, neumonía e infecciones de heridas, es posible entonces que uno de los manipuladores se encontrara enfermo.

La *Klebsiella pneumoniae* es los bovinos es causante de mastitis coliforme y diarrea de ternero. Esto nos indica la posibilidad de que una o varias vacas se encontraban enfermas al momento del ordeño, a pesar de que se encuentra prohibido. La *Klebsiella pneumoniae* también causa neumonía, infecciones urinarias y rinitis, como mencionamos anteriormente, el personal manipulador no tiene ningún tipo de vigilancia, las queseras no tiene registro sanitario y no hay entidad alguna que se encargue de la vigilancia, por esto cabe la posibilidad de que se encontraran enfermos al momento del contacto con la materia prima, durante el proceso o durante distribución.

#### **6.4 RESULTADO DE LA EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA**

La resistencia asociada a los antibióticos evaluados fue la siguiente: todas las cepas de aisladas fueron sensibles al ceftriaxone, a la ciprofloxacina y a la amikacina; solo una cepa de *Klebsiella pneumoniae* aislada de la quesera D presento resistencia a trimetropmsulfa; la cepa de *Enterobacter cloacae* de la quesera A y una cepa de *K. pneumoniae* de la quesera C presentaron resistencia a tetraciclina (oxitetraciclina). Por último todas las cepas aisladas mostraron resistencia a la eritromicina.(Ver Anexo N)

**Tabla 12.** Resultados del Antibiograma

Código	Identificación de Microorganismo	Antibiótico	Halo de inhibición (mm)	Patrón de Sensibilidad y Resistencia
Quesera A	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Eritromicina</i>	7	<i>Resistente</i>
		<i>Tetraciclina</i>	13	<i>Resistente</i>
		<i>Ceftriaxone</i>	27	<i>Sensible</i>
		<i>Trimetropimsulfa</i>	17	<i>Sensible</i>
		<i>Ciprofloxacina</i>	30	<i>Sensible</i>
Quesera B	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	<i>Eritromicina</i>	9	<i>Resistente</i>
		<i>Tetraciclina</i>	30	<i>Sensible</i>
		<i>Ceftriaxone</i>	34	<i>Sensible</i>
		<i>Trimetropimsulfa</i>	27	<i>Sensible</i>
		<i>Ciprofloxacina</i>	33	<i>Sensible</i>
		<i>Amikacina</i>	24	<i>Sensible</i>
Quesera C	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	<i>Eritromicina</i>	7	<i>Resistente</i>
		<i>Tetraciclina</i>	15	<i>Resistente</i>
		<i>Ceftriaxone</i>	25	<i>Sensible</i>
		<i>Trimetropimsulfa</i>	20	<i>Sensible</i>
		<i>Ciprofloxacina</i>	24	<i>Sensible</i>
		<i>Amikacina</i>	20	<i>Sensible</i>
Quesera D	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	<i>Eritromicina</i>	9	<i>Resistente</i>
		<i>Tetraciclina</i>	32	<i>Sensible</i>
		<i>Ceftriaxone</i>	30	<i>Sensible</i>
		<i>Trimetropimsulfa</i>	20	<i>Sensible</i>
		<i>Ciprofloxacina</i>	30	<i>Sensible</i>
		<i>Amikacina</i>	19	<i>Sensible</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	<i>Eritromicina</i>	7	<i>Resistente</i>
		<i>Tetraciclina</i>	28	<i>Sensible</i>
		<i>Ceftriaxone</i>	30	<i>Sensible</i>
		<i>Trimetropimsulfa</i>	14	<i>Resistente</i>
		<i>Ciprofloxacina</i>	30	<i>Sensible</i>
		<i>Amikacina</i>	20	<i>Sensible</i>

**Fuente:** Laboratorio Control De Calidad De Alimentos – UNIVERSIDAD SAN BUENAVENTURA CARTAGENA 2011 (Ver Anexo O)

## CONCLUSIONES

El procesamiento llevado a cabo en las queseras de los dos municipios no cumple con las normas mínimas de higiene ya que los recuentos de coliformes sobrepasan, los límites de los establecidos por el ministerio de protección social.

Los microorganismos aislados *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*, en las queseras correspondientes a los municipios de Arjona y Villanueva pertenecen a la misma familia de microorganismos.

La resistencia hallada, es concordante en ambos municipios.

## RECOMENDACIONES

Recomendamos un procesamiento más higiénico a las queseras evaluadas, ya que de esta forma mejoraría la calidad e inocuidad de los productos elaborados, estableciendo un programa para el control y vigilancia de la calidad del queso que es comercializado de forma masiva, asegurando la inocuidad del producto tanto al consumidor como al proveedor.

Evitar al máximo administrar antibióticos a los animales a partir de los cuales se obtiene la materia prima para la elaboración de los quesos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Martin G. Resistencia Bacteriana a  $\beta$ -lactámicos. Evolución y Mecanismos. *AVFT* 2002; 21: 107-16.
- [2] Druvic Lemus Espinoza\*, María Teresa Maniscalchi Badaoui, Mazn Hassoun, Heycarid Vizcaya; Estafilococos oxacilino resistentes en queso blanco fabricado en el estado Anzoátegui, Venezuela; *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2008; 28:48-54.
- [3] Otto Alberto Sussmann P., Lorenzo Mattos y Andrés Restrepo. Resistencia Bacteriana. *IMBIOMED*. [en línea] 2002. [fecha de acceso 22 Agosto de 2009]; 43(1). URL disponible en: [http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id\\_articulo=44230&id\\_seccion=1284&id\\_ejemplar=4486&id\\_revista=97](http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=44230&id_seccion=1284&id_ejemplar=4486&id_revista=97)
- [4] ICTA Universidad Nacional de Colombia. Guía para producir quesos colombianos. Bogotá 1994.
- [5] International Dairy Federation, World market for cheese, Bull. Doc. 146, Brussels, 1982.
- [6] R. Scott, Fabricación de queso, editorial ACRIBIA, S.A., 1991, 11 p.
- [7] M. Gomez, Tecnología de Lacteos, Universidad Nacional Abierta y Distancia, 2005, p. 136.
- [8] Ibid.,. P. 136
- [9] Ibid., p. 136
- [10] Ibid., p. 137
- [11] Ibid., p. 138
- [12] Ibid., p. 139
- [13] Ibid., p. 140

- [14] Ibid., p. 141
- [15] Ibid., p. 142
- [16] Ibid., p. 144
- [17] Ibid., p. 150
- [18] Ibid., p. 154
- [19] Ibid., p. 161
- [20] Ibid., p. 162
- [21] Ibid., p. 163
- [22] Ibid., p. 164
- [23] Ibid., p. 164
- [24] Ibid., p. 164
- [25] Ibid., p. 164
- [26] Ibid., p. 165
- [27] Ibid., p. 165
- [28] Ibid., p. 166
- [29] Ibid., p. 166
- [30] Ibid., p. 167
- [31] Ibid., p. 167
- [32] Ibid., p. 167
- [33] Microorganismos de los alimentos Ed. ACRIBIA, S.A. Zaragoza España. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) 2001 pag 497
- [34] Tolle, A (1980) The microflora of the udder. Bulletin of the International Dairy Federation, **120**, 4 -10.

- [35] Ibd., p. 498
- [36] Palmer , J (1980) Contamination of milk from he milking embironment. Bulletin of the International Dairy Federetion, **120**, 16 – 21
- [37] Cousin, M.A. (1982) Quality assurance and quality monitoring of UHT – products, Journal of the society of Sairy Technology, **43**, 42 – 5
- [38] Tolle, A (1980) Op. Cit
- [39] Hopley, Lara, Schalkwyk, Jo van. "Enterobacter." 29 de septiembre 2001. <http://www.anaesthetist.com/icu/infect/bacteria/gramneg/Findex.htm> # enterobacter.htm
- [40] Dijk, Karin van, Nelson, Eric B. "ácido graso competencia como mecanismo por el cual Enterobacter cloacae Suprime la germinación de esporangios de Pythium ultimum y amortiguación fuera." Applied and Environmental Microbiology. Vol. 66, N<sup>o</sup> 12. Diciembre de 2000. p. 5340-5347. <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/66/12/5340>
- [41] Fraser, Susan L. "Infecciones por Enterobacter." EMedicine. 08 de enero 2007. <http://www.emedicine.com/med/topic678.htm>
- [42] Brisse, S. y Verhoef, J. "Diversidad filogenética de Klebsiella pneumoniae y Klebsiella oxytoca aislados clínicos revelado por ADN polimórfico amplificado al azar, y los genes gyrA y secuenciación automatizada ribotipificación parC". Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva. 2001. Tomo 51. p. 915-924
- [43] Wen-Chien, David L. Paterson, Anthanasia J. Sagnimeni, y Denis S. Hansen. "Adquirida en la Comunidad Klebsiella Pneumoniae bacteriemia: en las diferencias clínicas. Global Patterns" PubMed Central (2002)
- [44] El portal agroindustrial colombiano. Klebsiellosis. Febrero 5 de 2011. <http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/ganaderia/bovinos/enfermedades/mastitis.htm>
- [45] C. Sanchez, ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana?, Universidad de Buenos Aires Argentina, 2006.

- [46] C. Zaforteza, J. Nocolau, Farmacología Antiinfecciosa, Antibioticos, 2007, p. 2-6
- [47] Ibid., p. 6
- [48] Saravia J. Sussmann O. Terapia antimicrobiana en: Medicina Interna Fundación Instituto de Reumatología, volumen I. Capítulo 112; Editorial Presencia, Bogotá, 1998.
- [49] Ibid., p. 124
- [50] Ibid., p. 132
- [51] A. Mediavilla, J. Flórez y J. M. García-Lobo. Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociaciones de antibióticos. MASSON, S.A. Ronda General Mitre, 149 - 08022 Barcelona, tercera edición 1997. P. 1084
- [52] Ibid p. 1084
- [53] Jorge O. Errecalde. (2004); USO DE ANTIMICROBIANOS EN ANIMALES DE CONSUMO Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública; DEPÓSITO DE DOCUMENTOS DE LA FAO (FAO PRODUCCIÓN Y SANIDAD ANIMAL 162). Roma, Italia.
- [54] C. Sanchez (2006) Op.cit
- [55] Creation Research Society Quarterly, Vol. 41(4)318-326. marzo de 2005.
- [56] FAO producción y sanidad animal, uso de antimicrobianos en animales de consumo, Pag 24, ROMA 2004.
- [57] Ash C, 1996. Antibiotic resistance: The new apocalypse? Trends in Microbiology, 4 (10): 371-372

# **ANEXOS**

## ANEXO A

### Información general de las queseras evaluadas

---

#### Quesera A

Localizada en el municipio de Villanueva, se procesan diariamente de 120 a 160 litros de leche equivalentes a 3 o cuatro cantinas. La leche proviene de fincas cercanas al pueblo, principalmente de la finca "El chorro". En esta quesera el proceso de elaboración del queso varía ya que no usan cuajo natural sino artificial. El queso producido es distribuido en el mismo pueblo, en Cartagena, Barranquilla, Maicao y Santa Rosa de Lima.

#### Quesera B

Localizada en el municipio de Villanueva. Se procesan diariamente de 160 a 200 litros de leche, equivalentes a 4 o 5 cantinas diarias. La leche proviene de fincas que se encuentran en la vía al pueblo, principalmente de la finca "El oriente". El producto se distribuye dentro del mismo pueblo, en Cartagena y en Santa Rosa de Lima.

#### Quesera C

Localizada en la finca "El Bálsamo", cerca del casco urbano del municipio de Arjona, Diariamente procesan la leche obtenida en la misma finca, que cuenta con unas 50 cabezas de ganado. El producto se distribuye en Arjona y Cartagena principalmente.

#### Quesera D

Localizada en el municipio de Arjona, diariamente producen aproximadamente 150 Kg de queso. La leche proviene de fincas de la ruta Rocha y de María la Baja. El producto es distribuido en Arjona, Turbaco y Cartagena.

---

## ANEXO B

### Agua de peptona



#### Agua de Peptona

*Peptone Water*

Cód.: 413794      Envase: 500 g

Se emplea como diluyente en muestras alimentarias, aguas y materiales diversos. Para la realización de la prueba del Indol en aquellos microorganismos capaces de producirlo.

#### Fundamento

La peptona tiene una elevada concentración de Triptófano, el cual es degradado a Indol por un cierto número de microorganismos entre ellos *E. coli*. La detección de este producto se hace añadiendo el reactivo de KOVACS después de la incubación (ver pág. IV - 8). Este medio es adecuado para determinar los organismos Indol-positivos y puede utilizarse en lugar de los Caldos Triptófano. En usos generales se puede emplear para el cultivo de una gran variedad de microorganismos, siempre y cuando no presenten exigencias particulares.

#### Fórmula (por litro)

Peptona..... 10 g  
Sodio Cloruro..... 5 g  
pH final: 7,2 ±0,2

#### Preparación

Suspender 15 g en 1 l de agua destilada; agitar hasta disolución total. Distribuir y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

#### Modo de empleo

Tratar según los fines a conseguir.

#### Reactivos auxiliares

Ref.	Descripción	Envase
252908	Reactivo de Kovacs DC *	100 ml

\* Producto Comercial

#### Control de calidad

#### Control físico-químico

Aspecto: polvo fino.      Solubilidad: total.  
Color: blanco-crema.      pH: 7,2 ± 0,2

#### Control microbiológico

Los siguientes resultados fueron obtenidos a partir de cepas patrón, después de incubación a temperatura de 37°C y observados a las 24 horas.

Microorganismos	Desarrollo	Formación de Indol
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Satisfactorio	+
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Satisfactorio	—
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Satisfactorio	—

#### Bibliografía

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2ª ed., APHA, (1984)

## ANEXO C

### Agar Plate Count

#### **Métodos Estándar (APHA), Agar** *Standard Methods Agar (APHA)*

Cód.: 413799

Envase: 500 g

Se emplea para el recuento microbiano en leches, carnes, productos alimenticios en general, productos farmacéuticos, productos cosméticos y cualquier tipo de muestra.

#### Historia

Buchbinder y sus colaboradores descubrieron que este medio para el recuento en placa en leches y sus derivados daba una mayor transparencia, que el medio clásico con leche desnatada. Ello facilita las lecturas tempranas, al tiempo que el crecimiento de las colonias es mayor con lo que se facilita el recuento. Como reconocimiento a su buena aptitud, este medio se ha convertido en oficial para APHA.

#### Fundamento

La composición del medio basada en la peptona de caseína como aportación nutritiva, el extracto de levadura como sustrato vitamínico y la glucosa como fuente energética, favorece el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos, sin precisar de otros aditivos.

#### Fórmula (por litro)

Extracto de Levadura .....	2,5 g
D(+)-Glucosa .....	1,0 g
Peptona de Caseína.....	5,0 g
Agar.....	15,0 g

pH final: 7,0 ± 0,2

#### Preparación

Suspender 23,5 g en 1 l de agua destilada. Calentar y agitar hasta disolución total. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

#### Modo de empleo

Procedase según determinación y tipo de muestra que se analice.

#### Control de calidad

##### Control físico-químico

Aspecto: polvo fino.

Solubilidad: ligeramente opalescente.

Color: tostado claro.

pH: 7,0 ± 0,2

##### Control microbiológico

Los siguientes resultados fueron obtenidos a partir de cepas patrón, después de incubación a temperatura de 37°C y observados a las 24 horas.

Microorganismos	Desarrollo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Satisfactorio
<i>Escherichia coli</i> ATCC 13782	Satisfactorio
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Satisfactorio
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Satisfactorio

#### Bibliografía

J. Appl. Bact., 33: 353-370 (1970)

Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 15<sup>th</sup> ed. APHA, (1985)

**Anexo D**  
**Fotos Recuento Mesófilos Aerobios**



## Anexo E

### Caldo Lactosado



#### Lactosado, Caldo

##### *Lactosed Broth*

Cód.: 413776      Envase: 500 g

Se emplea para el estudio de procesos de fermentación de la lactosa y en especial para la investigación de microorganismos Coliformes, especialmente *E. coli* en aguas, leches y productos alimenticios. No contiene indicadores ni inhibidores.

#### Historia

La formulación del medio corresponde a la descrita en la American Public Health Association para la investigación de bacterias Coliformes en aguas (1961) y productos lácteos (1965). El medio también corresponde a las recomendaciones de la USP y de la Farmacopea Europea.

#### Fundamento

Por la composición del medio, el contenido en elementos nutritivos y energéticos hace que permita el desarrollo sin restricción de bacterias Coliformes. La fermentación de lactosa producirá desprendimiento de gas que se pondrá de manifiesto en la campana de Durham.

#### Fórmula (por litro)

Lactosa .....	5,0 g
Extracto de Carne .....	3,0 g
Peptona de Gelatina.....	5,0 g

pH final: 6,9 ±0,2

#### Preparación

Disolver 13 g en 1 l de agua destilada. Distribuir en tubos de ensayo con campana de Durham y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar lo más rápidamente posible.

#### Modo de empleo

Utilizar el medio según los fines de aplicación previstos. Incubar a 37°C de 24 a 48 horas.

#### Control de calidad

##### Control físico-químico

Aspecto: polvo fino.      Solubilidad: total.  
Color: beige claro.      pH: 6,9 ± 0,2

##### Control microbiológico

Los siguientes resultados fueron obtenidos a partir de cepas patrón, después de incubación a temperatura de 37°C y observados a las 24 horas.

Microorganismos	Desarrollo	Producción de gas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Satisfactorio	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13683	Satisfactorio	+
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Satisfactorio	—
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	Satisfactorio	—

#### Bibliografía

- USP 25 (2002)
- Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2ª ed. APHA, (1984)
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 15ª ed. APHA (1981)
- Ph. Eur. IV (2002)

## Anexo F

### Agar EMB

#### **Eosina Azul de Metileno (EMB), Agar** *Eosin Methylene Blue Agar (EMB)*

Cód.: 413762

Envase: 500 g

Se emplea como medio diferencial para el aislamiento y diferenciación de bacterias entéricas Gram-negativas.

#### Historia

Los primeros en desarrollar este medio fueron Holt-Harris y Teague, que a partir de la mezcla de azul de metileno y eosina consiguieron un efecto diferenciador muy claro entre las bacterias capaces de fermentar la lactosa y las que no lo eran. La inclusión de la sacarosa fue propiciada para aquellos microorganismos que fermentan con dificultad la lactosa, y fácilmente la sacarosa.

#### Fundamento

Por la combinación de estos dos colorantes y los dos hidratos de carbono se pueden distinguir algunos géneros. Las bacterias lactosa-negativas y sacarosa negativas (*Salmonella* y *Shigella*) dan colonias incoloras, mientras que las lactosa y/o sacarosa-positivas dan colonias púrpura-violeta-negruzco con/sin un centro oscuro y quedan rodeadas de una zona incolora. Por el efecto de estos mismos colorantes también queda inhibido el crecimiento de la microflora acompañante, sobre todo la Gram-positiva. También es posible la identificación de *Candida albicans*.

#### Fórmula (por litro)

Eosina Amarillenta .....	0,4	g
Azul de Metileno.....	0,085	g
Lactosa .....	5,0	g
Peptona Bacteriológica.....	10,0	g
di-Potasio Hidrógeno Fosfato.....	2,0	g
Sacarosa .....	5,0	g
Agar.....	13,5	g

pH final: 7,2 ± 0,2

#### Preparación

Suspender 36 g en 1 l de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. No sobrecalentar. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

#### Modo de empleo

Sembrar en la superficie del medio.  
Incubar entre 35° y 37°C de 18 a 24 horas.

#### Control de calidad

##### Control fisico-químico

Aspecto: polvo fro. Solubilidad: opalescente con precipitado.  
Color: púrpura rosado. pH: 7,2 ±0,2

##### Control microbiológico

Los siguientes resultados fueron obtenidos a partir de cepas patrón, después de incubación a temperatura de 37°C y observados a las 24 horas.

Microorganismos	Desarrollo	Color de la Colonia
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Satisfactorio	Rosa
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Satisfactorio	Púrpura-violeta con brillo verde metálico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	Buena	Incolora
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Satisfactorio	Incolora
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inhibido	—

#### Bibliografía

Examination of Dairy Products. 10ª ed. APHA. (1953)

## Anexo G

### Sistema de Identificación BBL Crystal

 **BD Sistemas BBL Crystal**  
de Identificación

 **Español**

**Equipo para la identificación de patógenos entéricos/no fermentantes**

#### USO PREVISTO

El sistema de identificación **BBL Crystal** (ID) de bacterias entéricas/no fermentadoras (E/NF) sirve para la identificación de bacterias aerobias gram-negativas que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* así como también de los bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores de glucosa aislados con más frecuencia.

#### RESUMEN Y EXPLICACION

El sistema **BBL Crystal** E/NF ID es un método miniaturizado de identificación. Muchos de los análisis utilizados son modificaciones de los métodos clásicos. Estos incluyen tests para la fermentación, oxidación, degradación e hidrólisis de diversos sustratos. Además, contienen sustratos unidos a un cromógeno para detectar las enzimas que utilizan los microbios para metabolizar distintos sustratos.<sup>1-5</sup>

El kit **BBL Crystal** E/NF ID está compuesto de (i) las tapas del panel **BBL Crystal** E/NF, (ii) las bases **BBL Crystal** y (iii) los tubos de fluido (IF) de inóculo para organismos entéricos/heces **BBL Crystal** ID. La tapa contiene 30 sustratos deshidratados en las puntas de los dientes. La base tiene 30 pocillos de reacción. El inóculo del análisis está preparado con el fluido de inóculo y se utiliza para llenar los 30 pocillos de la base. Cuando se alinea la tapa con la base y se cierra en su lugar, el inóculo del análisis rehidrata los sustratos secos e inicia las reacciones del análisis.

Después de un periodo de incubación, se examinan los pocillos para observar cambios de color. Los cambios de color se producen como resultado de actividades metabólicas de los microorganismos. El patrón resultante de las 30 reacciones se convierte en un número de perfil de diez dígitos que se utiliza como base para la identificación.<sup>6</sup> Los patrones de la reacción bioquímica y enzimática de los 30 sustratos **BBL Crystal** E/NF con una amplia variedad de microorganismos son almacenados en la base de datos **BBL Crystal** E/NF ID. La identificación se deriva de un análisis comparativo del patrón de reacción del aislado del análisis con aquellos que existen en la base de datos. En la tabla 1 (página 36) se muestra una lista completa de taxones que comprenden la base de datos E/NF actual.

#### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los análisis utilizados en el sistema **BBL Crystal** E/NF ID están basados en la utilización y degradación de sustratos específicos por parte de los microorganismos detectados por distintos sistemas indicadores. Las reacciones de fermentación detectan la capacidad de un aislado para metabolizar los carbohidratos en ausencia de oxígeno atmosférico, y las reacciones de oxidación están basadas en la capacidad de un organismo para metabolizar el sustrato siendo el oxígeno el aceptor final de electrones. Ambas reacciones se detectan normalmente mediante el uso de un indicador de pH en el sustrato del análisis. Los sustratos cromógenos al sufrir hidrólisis producen cambios de color que pueden ser detectados visualmente. Además, existen otros análisis que detectan la capacidad de un organismo para hidrolizar, degradar, reducir o utilizar de otro modo un sustrato en el sistema **BBL Crystal** ID. En la sección "Reactivos" se describen las reacciones utilizadas por varios sustratos y una breve explicación de los principios utilizados en el sistema.

#### REACTIVOS

El panel **BBL Crystal** E/NF ID contiene 30 sustratos bioquímicos y enzimáticos según se describe a continuación. La ubicación del panel indica la fila y la columna donde se encuentra el pocillo (por ejemplo: 1J se refiere a la fila 1 en la columna J).

#### Reactivos y principios empleados en el sistema **BBL Crystal** E/NF ID

Ubicación del panel	Ingrediente activo	Código	Cantidad aprox. (g/10 mL)	Positivo	Negativo	Principio (Referencia)	
4A	Arabinosa	ARA	3,5	Dorado/amarillo	Naranja/rojo	La utilización de carbohidratos produce un descenso de pH y un cambio en el indicador (rojo feno). <sup>7-10</sup>	
4B	Manosa	MNS	3,0	Dorado/amarillo	Naranja/rojo		
4C	Sacarosa	SUC	2,8	Dorado/amarillo	Naranja/rojo		
4D	Melibiosa	MEL	1,0	Dorado/amarillo	Naranja/rojo		
4E	Ramnosa	RHA	3,0	Dorado/amarillo	Naranja/rojo		
4F	Sorbitol	SOR	3,5	Dorado/amarillo	Naranja/rojo		
4G	Manitol	MNT	1,8	Dorado/amarillo	Naranja/rojo		
4H	Adonitol	ADO	2,5	Dorado/amarillo	Naranja/rojo		
4I	Galactosa	GAL	1,5	Dorado/amarillo	Naranja/rojo		
4J	Inositol	INO	1,3	Dorado/amarillo	Naranja/rojo		
2A	p-n-p-fosfato	PHO	0,025	Amarillo	Entre incoloro	La hidrólisis enzimática del glucósido incoloro aril sustituido o éster de fosfato libera p-nitrofenol amarillo. <sup>1-5</sup>	
2B	p-n-p-a-β-glucósido	BGL	0,025	Amarillo	Entre incoloro		
2C	p-n-p-β-galactósido	NPG	0,06	Amarillo	Entre incoloro	La hidrólisis enzimática del sustrato amida incoloro libera p-nitroanilina de color amarillo. <sup>1-5</sup>	
2D	Prolina nitroanilida	PRO	0,07	Amarillo	Entre incoloro		
2E	p-n-p bis-fosfato	BPH	0,02	Amarillo	Entre incoloro		
2F	p-n-p-xilósido	BXY	0,03	Amarillo	Entre incoloro		
2G	p-n-p-a-arabinósido	AAR	0,03	Amarillo	Entre incoloro		
2H	p-n-p-fosforilcolina	PHC	0,03	Amarillo	Entre incoloro		
2I	p-n-p-β-glucuronido	GLR	0,02	Amarillo	Entre incoloro		
2J	p-n-p-N-acetil glucosamida	NAG	0,04	Amarillo	Entre incoloro		
1A	γ-L-glutamil p-nitroanilida	GGL	0,03	Amarillo	Entre incoloro		La hidrólisis enzimática del sustrato amida incoloro libera p-nitroanilina de color amarillo. <sup>1-5</sup>
1B	Esculina	ESC	0,14	Pardo/marrón	Transparente/paja		La hidrólisis de la esculina produce un precipitado negro en presencia de iones férricos. <sup>11</sup>

Reactivos y principios empleados en el sistema E/NF ID BBL Crystal (continuación)						
Ubicación del panel	Reactivos y principios empleados en el sistema	Código	Cantidad aprox. (g/10 ml)	Positivo	Negativo	Principio (Referencia)
1C	pH 6.0-DL-fenilalanina	PH6	0,1	Dorado/osc. naranja	Amarillo	La desaminación oxidativa de la fenilalanina produce un color pardo en presencia de iones férricos. <sup>7,11</sup>
1D	Urea	URE	0,2	Turquesa/Azul	Amarillo/Verde	La hidrólisis de la urea y el amonio resultante cambia el color del indicador de pH (azul de bromotimol). <sup>11,12</sup>
1E	Glicina	GLY	0,7	Turquesa/Azul	Amarillo/Verde	La degradación de la glicina libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol). <sup>12</sup>
1F	Citrato	CIT	0,0	Turquesa/Azul	Amarillo/Verde	La degradación del citrato libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol). <sup>13</sup>
1G	Ácido malónico	MLO	1,3	Turquesa/Azul	Amarillo/Verde	La degradación del malonato libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol). <sup>14</sup>
1H	Cloruro de trifenil tetrazolio	TTC	0,15	Rosado/rojo*	Transparente	La reducción del compuesto de tetrazolio produce la formación de un formazán rosa. <sup>5</sup>
1I	Arginina	ARG	1,5	Rojo/púrpura	Amarillo/pardo	El catabolismo enzimático produce una elevación del pH y un cambio en el color del indicador (púrpura bromocresol). <sup>7,11</sup>
1J	Lisina	LYS	0,5	Rojo/púrpura	Amarillo/pardo	El catabolismo enzimático produce una elevación del pH y un cambio en el color del indicador (púrpura bromocresol). <sup>7,11</sup>

\*El precipitado puede ser o no visible.

**Precauciones:** Para diagnóstico *in vitro*.

Después de su uso, todos los materiales infecciosos, incluyendo placas, torundas de algodón, tubos de inóculo y papeles de filtro utilizados para los análisis de oxidasa o indol y para los paneles BBL Crystal deben introducirse en la autoclave antes de su eliminación o incineración.

#### ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN/TIEMPO DE DURABILIDAD

Después de recibirlo, almacene el kit BBL Crystal E/NF a 2 – 25°C. NO CONGELAR. Si el kit o cualquiera de los componentes se almacena refrigerado, debe sacarse a temperatura ambiente antes de su uso.

**Tapas:** Las tapas están envasadas individualmente y deben guardarse sin abrir. Inspeccione el empaque visualmente para determinar si hay orificios o grietas en el paquete de papel aluminio. No utilice el panel si su empaque parece estar dañado. Si se almacenan de acuerdo con las recomendaciones, las tapas en el envase original, mantendrán la reactividad esperada hasta la fecha de caducidad.

**Bases:** Las bases vienen envasadas en dos juegos de diez, en bandejas de incubación BBL Crystal. Las bases están apiladas mirando hacia abajo para reducir al mínimo la contaminación por el aire. Almacene las bases no utilizadas en la bandeja, en una bolsa de plástico. Las bandejas vacías deben utilizarse para incubar los paneles.

**Fluido de inóculo:** El fluido de inóculo (IF) para organismos entéricos/heces BBL Crystal ID viene envasado en dos juegos de diez tubos. Inspeccione visualmente los tubos para determinar si tienen grietas, fugas, etc. No los utilice si parecen tener fugas, si el tazo o la tapa están dañados, o si hay evidencia visual de contaminación (p.e., palidez, turbidez). La fecha de caducidad se muestra en la etiqueta del tubo. El fluido de inóculo para organismos entéricos/heces BBL Crystal ID puede utilizarse con los paneles E/NF o RSE BBL Crystal.

#### RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Los sistemas BBL Crystal ID no están indicados para utilizarse directamente con las muestras clínicas. Utilice aislados de una placa de agar sangre, tal como agar de soja Trypticase con hemáties de oveja al 5%. El uso de una placa agar MacConkey es también aceptable. El aislado para análisis debe ser un cultivo puro de no más de 24 h. Solamente deben utilizarse las torundas con aplicador de punta de algodón para preparar el inóculo, ya que algunas torundas de poliéster pueden producir problemas con la inoculación de los paneles. (Vea "Limitaciones del procedimiento".) Una vez que se han sacado las tapas de las bolsas selladas, deben utilizarse en el plazo de 1 h para asegurar un rendimiento adecuado. La cubierta de plástico debería permanecer sobre la tapa hasta que se use.

El incubador utilizado debe estar humedecido para prevenir la evaporación del líquido de los pocillos durante la incubación. El nivel recomendado de humedad es del 40 – 60%. La utilidad de los sistemas BBL Crystal ID o de cualquier otro procedimiento de diagnóstico realizado sobre muestras clínicas está directamente influenciado por la calidad de las muestras. Se recomienda encarecidamente que los laboratorios empleen los métodos explicados en el Manual of Clinical Microbiology (Manual de Microbiología Clínica) para la recogida de muestras, su transporte y colocación en medios primarios de aislamiento.<sup>16</sup>

#### PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

**Materiales suministrados:** Kit BBL Crystal entérico/NF.

- 20 Tapas del panel entérico/NF BBL Crystal,
- 20 Bases BBL Crystal,
- 20 Tubos del fluido de inóculo para organismos entéricos/heces BBL Crystal. Cada tubo tiene aproximadamente 2,2 ± 0,1 mL de fluido de inóculo que contiene: 8,50 g de NaCl 0,8372 g de ácido 3-mercaptoindolpropionil-sulfónico, agua purificada hasta 1000 mL.
- 2 bandejas de incubación,
- 1 Cuaderno de informes BBL Crystal E/NF.

**Materiales necesarios pero no suministrados:** Torundas estériles de algodón (no utilice torundas de poliéster); Incubador (35 – 37°C) sin-CO<sub>2</sub> (humedad 40 – 60%); Visor del panel/caja de luz BBL Crystal (incluye las tablas de color de las reacciones BBL Crystal) con el libro de códigos electrónico del sistema BBL Crystal ID o el libro de códigos manual de BBL E/NF (ver "Disponibilidad"), o el Lector automático BBL Crystal; placa de cultivo no selectiva (por ejemplo, agar de soja Trypticase con hemáties de oveja al 5%); cuentagotas para el reactivo de indol DMACA BBL, cuentagotas para el reactivo de oxidasa BBL (véase "Disponibilidad").

También se necesitan el equipo y los materiales de laboratorio apropiados para la preparación, almacenamiento y manipulación de las muestras clínicas.

**Procedimiento de análisis:** El sistema BBL Crystal E/NF ID requiere los resultados del análisis de indol y oxidasa de colocar el panel BBL Crystal E/NF ID. También realizarse los análisis de indol y oxidasa a partir de una placa de agar selectiva de no más de 24 horas. Realice los análisis de indol y oxidasa según las instrucciones proporcionadas en el prospecto del envase para estos reactivos.

Consulte las ilustraciones de la Tabla de procedimientos, página 38.

1. Saque las tapas de la bolsa. Deseche el secante. Una vez sacadas de la bolsa, las tapas cubiertas deben utilizarse en el plazo de 1 hora. No utilice el panel si no hay secante en la bolsa. Vea la Fig. A.
2. Tome un tubo de inóculo y etiquételo con el número de muestra del paciente. Utilizando una técnica aséptica, con la punta de una torunda estéril de algodón (no utilice una torunda de jorister) o una varilla con aplicador de madera o un asa de cultivo estéril de plástico, tome una colonia grande bien aislada (con un diámetro de 2 – 3 mm o mayor) o 4 – 5 colonias más pequeñas de la misma morfología de una placa de sangre tal como agar de soja Trypticase con hemáties de oveja al 5%. El uso de una placa agar MacConkey es también aceptable.
3. Suspnda las colonias en un tubo de fluido de inóculo BBL Crystal para organismos aeróbicos/aerobios.
4. Vuelva a taponar el tubo y agítelo en un vórtex durante aproximadamente 10 – 15 s.
5. Tome una base y marque el número de muestra del paciente en la pared lateral.
6. Vierta todo el contenido del fluido de inóculo en el área objetivo de la base. Vea la Fig. B.
7. Sostenga la base con ambas manos y mueva el inóculo suavemente de un lado para otro a lo largo de las pistas hasta que se hayan llenado todos los pocillos. Haga retroceder cualquier líquido sobrante del Área objetivo y coloque la base en la parte superior de un banquillo. Vea la Fig. C.
8. Alinee la tapa de forma que el extremo marcado de la tapa esté en la parte superior del área objetivo de la base. Vea la Fig. D.
9. Apriete hasta que perciba una ligera resistencia. Coloque el pulgar en el borde de la tapa hacia la parte media del panel en cada lado y apriete simultáneamente hasta que la tapa encaja en su lugar (tiene que escuchar dos "clics"). Vea la Fig. E.

**Placa de pureza:** Utilizando un asa de cultivo estéril, tome una pequeña gota del tubo de fluido de inóculo antes o después de inocular la base e inocular un tubo de agar inclinado o placa (cualquier medio apropiado) para comprobar la pureza. Deseche el tubo de fluido de inóculo usado en un recipiente para materiales biológicamente peligrosos. Inocule el tubo de agar inclinado o la placa durante 18 – 24 h a 35 – 37°C en un incubador sin CO<sub>2</sub>. La placa o tubo de agar inclinado de pureza puede utilizarse también para cualquier análisis suplementario o serología, si fuera necesario.

**Incubación:** Coloque los paneles inoculados en las bandejas de incubación. En una bandeja pueden caber diez paneles (5 filas de 2 paneles). Todos los paneles deben incubarse mirando hacia abajo (las ventanas más grandes mirando hacia arriba; la etiqueta mirando hacia abajo) en un incubador sin CO<sub>2</sub> con una humedad del 40 – 60%. No deben apilarse las bandejas en más de dos alturas durante la incubación. El tiempo de incubación para los paneles E/NF es de 18 – 20 h a 35 – 37°C. Vea la Fig. 5.

**Lectura:** Después del periodo recomendado de incubación, saque los paneles del incubador. Todos los paneles deben leerse hora abajo (las ventanas más grandes arriba; la etiqueta mirando hacia abajo); utilice la caja de luz o el visor del panel BBL Crystal. Vea la Fig. 6. Consulte la tabla de colores de la reacción y/o el apartado de "Reactivos" para obtener una interpretación de las reacciones. Use el cuaderno de informes BBL Crystal E/NF para registrar las reacciones. Como método alternativo, puede utilizar el lector automático BBL Crystal para leer los paneles.

**Cálculo del número de perfil de BBL Crystal:** A cada resultado del análisis con un resultado positivo se le asigna un valor de 4, 2, ó 1, correspondiendo a la fila donde está ubicado el análisis. Se asigna un valor de 0 (cero) a cualquier resultado negativo. Después se suman los números (valores) resultantes de cada reacción positiva en cada columna. Se genera un número de 10 dígitos; éste es el número de perfil.

**Ejemplo**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
2	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Perfil	5	4	6	0	2	4	4	3	7	1

El número de perfil resultante y los resultados del análisis fuera de línea (indol y oxidasa) deben introducirse en un PC en el que se haya instalado el libro de códigos electrónico del sistema BBL Crystal ID, para obtener la identificación. También hay disponible un libro de códigos manual. Si no hay un PC disponible, póngase en contacto con el Servicio técnico de BD para obtener ayuda con la identificación. Si se utiliza el lector automático BBL Crystal, el PC identifica automáticamente los organismos.

**Control de calidad por parte del usuario:** La prueba del control de calidad se recomienda para cada lote de paneles como se indica a continuación:

1. Coloque un panel BBL Crystal E/NF con *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495 por cada procedimiento recomendado (consulte "Procedimiento del análisis").
2. Entonces incube el panel durante 18 – 20 h a 35 – 37°C.
3. Lea el panel con la caja de luz o visor del panel BBL Crystal y la tabla de colores de la reacción; registre las reacciones utilizando el cuaderno de informes BBL Crystal E/NF. Como método alternativo, puede leer el panel en el lector automático BBL Crystal.
4. Compare las reacciones registradas con las enumeradas en la Tabla 2 (página 37). Si se obtienen resultados discrepantes, confirme la pureza de la cepa de control de calidad antes de ponerse en contacto con el Servicio técnico de BD.

Los resultados esperados del análisis de las cepas adicionales del análisis de control de calidad también están enumeradas en la Tabla 2 (página 37).

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El sistema BBL Crystal E/NF ID está diseñado para los taxones E/NF proporcionados. Los taxones diferentes a los enumerados en la Tabla 1 no están indicados para su uso en este sistema.

Los sistemas de identificación BBL Crystal utilizan un microambiente modificado; por lo tanto, los valores esperados para sus análisis individuales pueden diferir de la información establecida previamente con las reacciones de análisis convencionales. La precisión del sistema de identificación BBL Crystal E/NF está basada en el uso estadístico de análisis diseñados especialmente y en una base de datos exclusiva.

Cuando el antisuero está disponible, la identificación bioquímica de organismos seleccionados, tal como *Salmonella*, *Salmonella* subgrupo 3, *Shigella*, *Escherichia coli* A-D enteropatógenos, y *Vibrio cholerae*, debe ampliarse mediante un análisis antigénico.<sup>5,16</sup>

Solamente deben utilizarse las torundas con aplicador de punta de algodón para preparar la suspensión de inóculo, ya que algunas torundas de poliéster pueden hacer que el fluido de inóculo se vuelva espeso. Esto puede producir una cantidad insuficiente de inóculo para llenar los pocillos. Una vez que se han sacado las tapas de las bolsas selladas, deben utilizarse en el plazo de 1 hora para asegurar un rendimiento adecuado. La cubierta de plástico debe permanecer sobre la tapa hasta que se use.

El incubador donde están colocados los paneles debe estar humectado para prevenir la evaporación del líquido de los pocillos durante la incubación. El nivel recomendado de humedad es el 40 – 60%.

Los paneles, después de la inoculación, deben solamente incubarse mirando hacia abajo (las ventanas más grandes hacia arriba; la etiqueta mirando hacia abajo) para maximizar la efectividad de los sustratos.

Las colonias deben tomarse de una placa de agar sangre, tal como agar de soja Trypticase con hematies de oveja al 5%. El uso de una placa agar MacConkey es también aceptable.

Los sistemas de identificación BBL Crystal NO están indicados para utilizarlos directamente con las muestras clínicas.

#### CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

**Reproducibilidad:** En un estudio interno en el que participaban tres (3) laboratorios clínicos, se estudió la reproducibilidad de las reacciones de (30) sustratos E/NF mediante repetición del análisis. La reproducibilidad de las reacciones con sustrato individual osciló del 96,3 a 100%. La reproducibilidad total de un panel BBL Crystal E/NF fue del 99,6%.

**Precisión de la identificación:** El rendimiento del sistema de identificación BBL Crystal E/NF ID fue comparado con sistemas disponibles actualmente en el comercio utilizando aislados clínicos y cultivos madre.

En un estudio interno, se evaluó el rendimiento de BBL Crystal E/NF. Se analizaron los resultados de 169 aislados entéricos y no entéricos (representando 45 especies). Las identificaciones discrepantes se resolvieron utilizando otros sistemas comerciales. Estos resultados se muestran a continuación:

N = 169	ID sin análisis suplementario	ID con análisis suplementario	Ningún ID o identificado erróneamente
BBL Crystal E/NF	163 (96,4%)	167 (98,8%)	2 (1,2%)

Se evaluó el rendimiento del análisis BBL Crystal ID para organismos entéricos/no fermentadores en tres laboratorios clínicos independientes.<sup>13</sup> Se utilizaron aislados de rutina que llegaron al laboratorio clínico así como también aislados identificados, previamente elegidos por los laboratorios de los ensayos clínicos, para establecer las características de rendimiento.

De los 299 aislados clínicos frescos analizados por los métodos actuales de identificación de los laboratorios, el sistema BBL Crystal ID comunicó correctamente el 96,7% (289), entre ellos 16 casos donde se comunicaron dos o tres organismos y se necesitó un análisis suplementario para conseguir un resultado válido.

De las 291 cepas en cuestión identificadas previamente y confirmadas por los métodos actuales de identificación de los laboratorios, el sistema BBL Crystal ID comunicó correctamente el 96,9% (282), entre ellos 8 casos donde se habían comunicado dos o tres organismos y se necesitó un análisis suplementario para conseguir un resultado válido.<sup>13</sup>

#### DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción	Nº de cat.	Descripción
245000	Kit BBL Crystal ID para organismos entéricos/no fermentadores, que contiene 20: Tapas para el panel entérico/NF BBL Crystal, bases BBL Crystal, tubos de fluido de inóculo BBL Crystal ID para organismos entéricos/heces.	245036	Tubo de luz blanca para el visor del panel BBL Crystal.
245026	Caja de luz BBL Crystal, modelo nacional, 110 V, 60 Hz.	245001	Libro de códigos electrónico del sistema BBL Crystal ID.
245027	Caja de luz BBL Crystal, modelo europeo, 220 V, 50 Hz.	245002	Libro de códigos manual de sistemas de identificación BBL Crystal para organismos entéricos/no fermentadores.
245028	Foco de luz BBL Crystal.	245029	Inóculo para organismos entéricos/heces BBL Crystal ID. Fluido, cartón de 10.
245031	Visor del panel BBL Crystal, modelo nacional, 110 V, 60 Hz.	245300	Lector automático BBL Crystal.
245032	Visor del panel BBL Crystal, modelo europeo, 220 V, 50 Hz.	221239	Agar de soja Trypticase con hematies de oveja al 5%, paquete de 20 placas.
245033	Visor del panel BBL Crystal, modelo japonés, 100 V, 50/60 Hz.	221261	Agar de soja Trypticase con hematies de oveja al 5%, cartón de 100 placas.
245034	Tubo de luz UV de onda larga para el visor del panel BBL Crystal.	261187	Cuentagotas para el reactivo de indol BBL DMACA, 50s.
		261181	Cuentagotas para el reactivo de oxidasa BBL DMACA, 50s.

**BIBLIOGRAFIA:** Véase "Referencias" en el texto en inglés.

Table / Tableau / Tabelle / Tabelle / Quadro / Tabla 1

Taxa in BBL Crystal E/NF ID System / Taxonomie dans le système BBL Crystal E/NF ID / Taxonomia nel sistema BBL Crystal E/NF ID / Grupos taxonómicos no Sistema de ID de E/NF BBL Crystal / Grupos taxonómicos del sistema BBL Crystal E/NF ID

<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Flavobacterium breve</i>	<i>Salmonella arizona</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Flavobacterium gleum</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Flavobacterium indologenes</i>	<i>Salmonella paratyphi</i> A
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	<i>Salmonella</i> species
<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Flavobacterium odoratum</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Aeromonas veronii</i>	<i>Haemophilus alveii</i>	<i>Serratia ficaria</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Serratia fonticola</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Klebsiella ozaena</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Cederea davisiae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia odorifera</i> 1
<i>Cederea lapagei</i>	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	<i>Serratia odorifera</i> 2
<i>Cederea neteri</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Serratia plymuthica</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	<i>Serratia rubidaea</i>
<i>Chryseomonas luteola</i>	<i>Legionella adarbarboxylata</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Moellerella wisconsinensis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Shigella</i> species ( <i>S. boydii</i> , <i>S. flexneri</i> )
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Edwardsiella ictalurae</i>	<i>Pasteurella aerogenes</i>	<i>Sporobacterium multivorum</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Pasteurella haemolytica</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Tatumella ptyseus</i>
<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Proteus penneri</i>	<i>Vibrio damsela</i>
<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>
<i>Enterobacter taylorae</i>	<i>Providencia ahlificiens</i>	<i>Vibrio hollisae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Vibrio metschnikovii</i>
<i>Escherichia coli</i> serogroup / sèrogrupe / Serogrupo / sierogruppo / serogrupo O111	<i>Providencia rustigiani</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Escherichia coli</i> serogroup / sèrogrupe / Serogrupo / sierogruppo / serogrupo O157	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> AD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Pseudomonas diminuta</i>	<i>Weeksella virosalvoohekum</i>
<i>Escherichia hermani</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> group / grupe / Gruppo / grupo / grupo ( <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. frederiksenii</i> , <i>Y. intermedia</i> , <i>Y. kristensenii</i> )
<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Pseudomonas gladii</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Ewingella americana</i>	<i>Pseudomonas peacockii</i>	<i>Yokenella regensburgeri</i>
<i>Flavimonas oryzaeobacters</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	Miscellaneous Gram-Negative Bacilli*
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	
	<i>Pseudomonas vasculorum</i>	
	<i>Rahnella aquahilis</i>	

\*Miscellaneous Gram-Negative Bacilli\* refers to a group of oxidase positive species that are relatively inactive and indistinguishable from each other in BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID System. Refer to Tables 1 and 2 provided in this insert for further identification when the first choice identification is "Miscellaneous Gram-Negative Bacilli."

1 Les "bactéries Gram-négatives divers" correspondent à un groupe de souches oxydase positive relativement inactives et non discernables les unes des autres dans le système BBL Crystal E/NF ID. Se reporter aux Tableaux 1 et 2 des instructions pour toute identification complémentaire lorsque le premier choix d'identification est "Bactéries Gram-négatives divers".

1 Die Bezeichnung "verschiedene gramnegative Bakterien" bezieht sich auf eine Gruppe oxidasepositiver Spezies, die im BBL Crystal Enteric/Nonfermenter-ID-System relativ inaktiv und undifferenzierbar sind. Falls die erste Identifizierung "verschiedene gramnegative Bakterien" lautet, sind zur genaueren Identifizierung die in dieser Packungsbeilage enthaltenen Tabellen 1 und 2 heranzuziehen.

1 L'espressione "miscelanea di batteri gram-negativi" si riferisce ad un gruppo di specie ossidasi positive che sono relativamente inattive e non distinguibili tra loro nel sistema BBL Crystal E/NF ID. Per ulteriore identificazione, qualora l'identificazione di prima scelta sia "miscelanea di batteri gram-negativi", consultare le Tabelle 1 e 2 fornite in questo foglietto illustrativo per agevolare l'utente.

1 "Vários Bactérios Gram-Negativos" refere-se a um grupo de espécies positivas para a oxidação que são relativamente inativas e indistinguíveis entre si no Sistema BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID. Consulte os Quadros 1 e 2 que constam deste folheto informativo para uma identificação adicional quando a primeira escolha de identificação é "Vários Bactérios Gram-Negativos".

1 "Miscelánea de bacterias gram-negativas" se refiere a un grupo de especies positivas a la oxidasa que son relativamente inactivas e indistinguibles entre si en el sistema BBL Crystal E/NF ID. Consulte las Tablas 1 y 2 suministradas en este prospecto para la identificación más precisa cuando la primera identificación es "Miscelánea de bacterias gram-negativas".

"Miscellaneous Gram-Negative Bacilli" include / Le groupe "bactéries Gram-négatives divers" comprend / "verschiedenen gramnegativen Bakterien" zählen / La "miscellanea di batteri gram-negativi" include / "Miscelánea de bacterias gram-negativas" incluye:

<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Methylobacterium</i> species
<i>Alcaligenes plechadlii</i>	<i>Moraxella facuata</i>
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> subsp. <i>denitrificans</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> subsp. <i>xylosoxidans</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Ofiteia urethralis</i>
<i>Burkholderia pickettii</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
CDC Group IV C-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ?
<i>Comamonas acidovorans</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>
<i>Comamonas testosteroni</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Pseudomonas putida</i> ?

2 May also be identified separately in database / 2 Possibilité d'identification séparé dans la base de données / 2 Kann in der Datenbank auch separat identifiziert werden / 2 Possono essere identificati anche separatamente nella base-dati / 2 También podem ser identificados em separado na base de dados. / 2 Puede encontrarse identificado por separado en el banco de datos

Tabla / Tableau / Tabelle / Tabella / Quadro / Tabla 2

Quality Control Chart For BBL Crystal E/NF ID System / Tableau de contrôle de qualité du système BBL Crystal E/NF ID / Qualitätskontroll-Tabelle für das BBL Crystal E/NF-ID-System / Tabella del controllo di qualità per il sistema BBL Crystal E/NF ID / Quadro de Controle de Qualidade para o Sistema BBL Crystal E/NF ID / Quadro de control de calidad para el sistema BBL Crystal E/NF ID

Location	Code	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 33495	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17925	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 35069	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27832
4A	ARA	+	V	-	-	-	-
4B	MNS	+	-	-	-	-	V
4C	SUC	+	-	-	+	-	-
4D	MEL	V	+	-	-	V	-
4E	RHA	+	+	-	-	-	-
4F	SCR	+	+	-	-	-	-
4G	MNT	V	-	-	-	-	-
4H	ADG	+	-	-	-	-	-
4I	GAL	+	-	-	+	-	+
4J	INC	+	-	-	-	-	-
2A	PHQ	V	V	-	+	V	V
2B	BGL	+	-	-	+	V	-
2C	NPG	+	+	-	-	-	-
2D	PRO	V	-	-	-	-	+
2E	DPH	V	V	-	+	V	-
2F	BXY	+	-	-	-	+	-
2G	AAR	(+)	(-)	-	-	(+)	-
2H	PHC	-	-	-	+	-	V
2I	SLR	-	-	-	-	-	-
2J	NAG	-	-	-	-	+	-
1A	GGL	+	-	-	V	+	+
1B	ESC	+	-	-	+	V	-
1C	PHE	-	-	-	+	-	-
1D	LRE	V	-	V	+	V	+
1E	GLY	-	-	V	V	-	+
1F	QT	+	-	-	(+)	+	+
1G	MLO	-	-	-	-	+	+
1H	TTC	+	(+)	-	V	+	+
1I	ARC	V	V	-	V	(+)	-
1J	LYS	+	+	-	-	V	V

+ = positive reaction - = negative reaction V = variable reaction (+) = Usually positive, but occasionally negative /  
 + = réaction positive - = réaction négative V = réaction variable (+) = généralement positive, mais parfois négative /  
 + = positive Reaktion - = negative Reaktion V = variable Reaktion (+) = In der Regel positiv, jedoch gelegentlich negativ /  
 + = reazione positiva - = reazione negativa V = reazione variabile (+) = In genere positiva, ma occasionalmente negativa /  
 + = reação positiva - = reação negativa V = reação variável (+) = Habitualmente positiva, mas ocasionalmente negativa /  
 + = reacción positiva - = reacción negativa V = reacción variable (+) = generalmente positivo pero a veces negativo

**Anexo H**  
**Fotos Identificación de Cepas**



## Anexo I

### Lista de Antibióticos más usados en ganado en el departamento de Bolívar.

Nombre comercial	Composición	Dosis	Tiempo de retiro para la producción láctea.
<b>Antibióticos</b>			
Oxitetraciclina	Oxitetraciclina clorhidrato 50 mg.	10 ml / 100 Kg. peso corporal.	6 días.
Tylan 200	Tilosina 20 g., alcohol bencílico 4 ml.	1ml / 20 Kg. peso corporal.	8 días.
Eritromicina	Eritromicina	4 a 8 mg/KPV (2 a 4 ml cada 100 kg KPV)	8 días.
Quinocalf 5%	Erofloxacina 50 mg.	5 ml / 100 Kg. peso corporal.	72 horas
Sulfametazina 25%	Sulfametazina sódica 25 gr.	4 ml / 5 Kg. peso corporal	96 horas
Sultrax	Trimetropin 80 mg., sulfametazina 400 mg.	1 – 1, 5 ml / 30 Kg. peso corporal.	3 días.
Macroespíaran	Espiramicina 13.000.000 U.I.	1 ml / 16 kg. peso corporal .	72 horas
<b>Otros medicamentos utilizados</b>			
Gluconato de calcio	Gluconato de calcio 20 g., calcio 1.9 g.	110 ml /100 Kg. peso corporal	
Ivermectina	Ivermectina 10 mg.	1 ml / 50 Kg. peso corporal	No se debe administrar en vacas para producción de leche.

**Fuente:** UMATA- Bolívar

## Anexo J

### Agar Mueller – Hinton

#### **Mueller-Hinton, Agar**

*Mueller-Hinton Agar*

Cód.: 413787      Envase: 500 g

#### **Mueller-Hinton, Caldo**

*Mueller-Hinton Broth*

Cód.: 413788      Envase: 500 g

Se emplea para ensayos de sensibilidad de los microorganismos frente a antibióticos y sulfamidas. También en aislamiento primario de *Gonococos* y *Meningococos*.

#### Historia

Mueller y Hinton tomaron como punto de partida de sus estudios el medio complejo de Gordon y Hine con el fin de encontrar un medio capaz de resistir el autoclavado. El primer paso fue sustituir la harina de guisante por el almidón, que a su vez protegía el medio de las toxinas que pudieran estar presentes. Después sustituyeron la peptona de carne por la de caseína hidrolizada, que por ser más fragmentada favorecía más los crecimientos. Finalmente ha sido reconocido como el más indicado para los ensayos de sensibilidad a antibióticos y sulfamidas por el procedimiento de los discos. El Caldo MUELLER-HINTON es el más utilizado en la determinación de la "concentración mínima inhibitoria" (CMI) por la técnica de diluciones seriadas.

#### Fundamento

En la preparación de este medio es fundamental que las concentraciones de timina, timidina y ácido 4-aminobenzoico, sean lo suficiente bajas para no inhibir la actividad antibacteriana de antibióticos y sulfamidas. Las dos primeras inhiben los antibióticos y el último las sulfamidas. El ensayo de sensibilidad de un microorganismo frente a un antibiótico se puede realizar sobre placas de agar Mueller-Hinton por procedimientos de difusión, por diluciones seriadas o por técnicas turbidimétricas en el Caldo Mueller-Hinton. En las técnicas de difusión se mide el halo de inhibición del crecimiento confluyente alrededor del depósito de antibiótico (discos, torredillas, etc.). El diámetro del círculo de inhibición es inversamente proporcional a la concentración mínima inhibitoria (CMI) del agente antibacteriano.

#### Fórmula (por litro) del Caldo

Almidón ..... 1,5 g  
Infusión de Carne (a partir de 300 g)..... 2,0 g  
Peptona de Caseína Hidrolizada..... 17,5 g

pH final: 7,4 ± 0,2

#### Fórmula (por litro) del Agar

Almidón ..... 1,5 g  
Infusión de Carne (a partir de 300 g)..... 2,0 g  
Peptona de Caseína Hidrolizada..... 17,5 g  
Agar..... 17,0 g

pH final: 7,4 ± 0,2

#### Preparación

Suspender 38 g (Agar) ó 21 g (Caldo) en 1 l de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Si se desea añadir sangre, dejar enfriar hasta 45°C y añadir asepticamente sangre estéril desfibrinada; la mezcla con sangre debe chocolatearse calentando a 80°C durante 10 minutos, si se desea obtener desarrollo de *Neisseria*. No sobrecalentar. Si se precisa refundir el medio, calentar el menor tiempo posible.

#### Modo de empleo

El antibiograma debe ser efectuado sobre cultivos puros. En las técnicas de difusión se inoculan las placas de Agar para que formen un confluyente. Los discos u otros contenedores del antibiótico deben apoyarse sobre el medio de manera que queden adheridos a él. Incubar a la temperatura óptima del microorganismo durante 24 horas.

## Control de calidad

### Control físico-químico

Aspecto: polvo fino. Solubilidad: ligeramente opalescente.  
 Color: beige. pH: 7,4 ± 0,2

### Control microbiológico en el Mueller-Hinton, Agar

Los siguientes resultados fueron obtenidos a partir de cepas patrón, después de incubación a temperatura de 37°C y observados a las 24 horas.

Microorganismos	Desarrollo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Satisfactorio
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	Satisfactorio
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Satisfactorio
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 33186	Satisfactorio
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6303	Satisfactorio
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Satisfactorio

### Control microbiológico en el Mueller-Hinton, Caldo

Los siguientes resultados fueron obtenidos a partir de cepas patrón, después de incubación a temperatura de 37°C y observados a las 24 horas.

Microorganismos	Desarrollo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Satisfactorio
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Satisfactorio
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Satisfactorio
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Satisfactorio
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Satisfactorio
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	Satisfactorio

### Bibliografía

- Amer. J. Clin. Pathol., 45: 493-496 (1966)  
 J. Clin. Microbiol., 22: 369-374 (1965)  
 Standardization of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Test. WHO. (1961)

## Anexo K

Tabla de Mc Crady

<b>Numero más probable (NMP)</b>			
Numero de tubos positivos en cada dilución			NMP
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	X gramo
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
3	0	0	23
3	0	1	40
3	1	0	40
3	1	1	70
3	2	0	90
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	200
3	3	1	500
3	3	2	1100

*Fuente: Microorganismos de los Alimentos Vol.1,  
2da Edición, Editorial ACRIBIA, S.A. Pág 134*

**Anexo L**  
**Norma quesos frescos**

---

**NORMA TÉCNICA COLOMBIANA    NTC 750 (Cuarta actualización)**

---

Tabla 2. Requisitos microbiológicos para el queso fresco

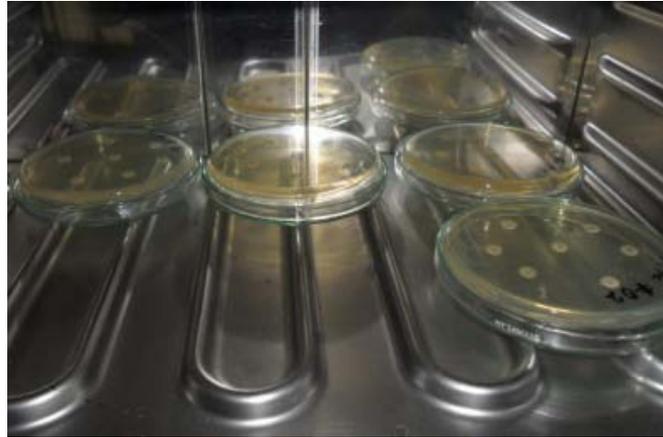
Requisitos	n	m	M	c
Exámenes de rutina:				
Recuento de coliformes, UFC/g	5	1 000	5 000	2
Recuento de <i>E. coli</i> , UFC/g	5	<10	--	0
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	5	100	500	2
Exámenes especiales:				
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva, UFC/g	5	10	100	2
Detección de <i>Salmonella</i> /25 g	5	Ausente	-	0
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	Ausente	-	0
en donde <i>n</i> :        número de muestras por examinar <i>m</i> :        índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad <i>M</i> :        índice máximo permisible para identificar nivel de calidad aceptable <i>c</i> :        número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M				

**Anexo M**  
**Fotos locales de producción**



## Anexo N

### Fotos evaluación de la resistencia



## ANEXO O

### Informes de resultado Laboratorio control de calidad de Alimentos Universidad de San Buenaventura.

	<b>LABORATORIO CONTROL DE CALIDAD DE ALIMENTOS</b>	Pág 1 de 1
	<b>INFORME DE RESULTADOS</b>	Código: F-GR-01
		2009-02-27/ V1

FECHA:  
FECHA RECIBIDO DE MUESTRA:  
PROCEDENCIA:

03 de febrero de 2011  
01 de febrero de 2011  
**ESTUDIANTES UNIVERSIDAD DE  
CARTAGENA**

Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	CÓDIGO	IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMO	ANTIBIOGRAMA	PATRON DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA
78	Aislado Bacteriano de Muestra de Queso	A	<i>Enterobacter cloacae</i>	Eritromicina: 7mm	Resistente
				Tetraciclina:13mm	Resistente
				Ceftriaxone:27mm	Sensible
				TrimetropimSulfa:17mm	Sensible
				Ciprofloxacina: 30mm	Sensible
79	Aislado Bacteriano de Muestra de Queso	B	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	Eritromicina: 9mm	Resistente
				Tetraciclina:30mm	Sensible
				Ceftriaxone:34mm	Sensible
				TrimetropimSulfa:27mm	Sensible
				Ciprofloxacina:33mm	Sensible
80	Aislado Bacteriano de Muestra de Queso	C	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	Eritromicina: 7mm	Resistente
				Tetraciclina:15mm	Resistente
				Ceftriaxone:25mm	Sensible
				TrimetropimSulfa:20mm	Sensible
				Ciprofloxacina:24mm	Sensible
81	Aislado Bacteriano de Muestra de Queso	01	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	Amikacina: 24mm	Sensible
				Eritromicina: 7mm	Resistente
				Tetraciclina:32mm	Sensible
				Ceftriaxone:30mm	Sensible
				TrimetropimSulfa:20mm	Sensible
82	Aislado Bacteriano de Muestra de Queso	02	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	Ciprofloxacina:30mm	Sensible
				Amikacina: 19mm	Sensible
				Eritromicina: 7mm	Resistente
				Tetraciclina:28mm	Sensible
				Ceftriaxone:30mm	Sensible
				TrimetropimSulfa:14mm	Resistente
				Ciprofloxacina:30mm	Sensible
				Amikacina: 20mm	Sensible

Atentamente,



**Piedad Franco Anaya** - Bacterióloga – Reg. 5285  
Esp. Aseguramiento de la Calidad Microbiológica de los Alimentos  
Colegio Mayor de Antioquia - U. San Buenaventura

Universidad de San Buenaventura  
Cartagena  
Laboratorio Control de Alimentos

