



Identificación de Bacterias Gram positivas en muestras de leche cruda, obtenida por ordeño manual

Identification of Gram-positive Bacteria in raw milk samples obtained by manual milking

Identificação de bactérias Gram-positivas em amostras de leite cru obtidas por ordenha manual

ARTÍCULO ORIGINAL



Escanea en tu dispositivo móvil o revisa este artículo en:
<https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v8i22.249>

Sara Melissa Yupangui Asanza¹
syupangui2@utmachala.edu.ec

Jackson Daniel Moran Castillo¹
bioq.moran@gmail.com

Carmen Elizabeth Silverio Calderón¹
csilverio@utmachala.edu.ec

Silvana Gabriela Manzanares Loaiza¹
smanzanares@utmachala.edu.ec

Alex Rodrigo Flores Acosta¹
aflores@utmachala.edu.ec

Luis Eduardo Zuñiga-Moreno²
Izuniga@uagraria.educ.ec

¹Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador

²Universidad Agraria del Ecuador. Guayaquil, Ecuador

Artículo recibido 21 de noviembre 2023 / Arbitrado 22 de diciembre 2023 / Publicado 20 de enero 2024

RESUMEN

La leche de vaca es uno de los alimentos de mayor consumo por su abundante composición de proteínas, ácidos grasos y micronutrientes esenciales. Sin embargo, estas características, aunadas a las medidas higiénicas deficientes en el método de obtención de este producto a través del ordeño manual; así como, su recolección, almacenamiento y transporte, lo hacen susceptible a contaminación por microorganismos y por tanto responsable de enfermedades a nivel gastrointestinal. **Objetivo.** Identificar bacterias Gram positivas presentes en leche cruda de vaca, obtenida por ordeño manual, provenientes de cinco vaquerías ubicadas en el Cantón de Chilla en la Provincia de El Oro, en Ecuador. **Materiales y métodos.** Por muestreo aleatorio se obtuvieron 20 muestras de leche, cada una de 150 ml, recolectadas del ordeño manual realizado en cinco vaquerías. Una vez recolectadas las muestras, se aplicó la Normativa INEN1 529-2:99 para el manejo y transporte. Asimismo, se realizó un análisis microbiológico según los protocolos de las normativas NTE INEN9:2012 y NTE INEN 1529-5:2006, en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Universidad Técnica de Machala. Para la detección e identificación de las bacterias Gram positivas se aplicaron métodos de dilución, caracterización, prueba bioquímica enzimática y tinción de Gram. **Resultados.** Las características fisicoquímicas de densidad y pH, de las muestras cumplieron con la Normativa. En todas las muestras, se observó presencia de turbidez, gas y precipitado en las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. Las pruebas enzimáticas y el cultivo microbiológico identificaron la presencia de *Staphylococcus aureus*. **Conclusiones.** El género *Staphylococcus* especie *aureus* fue la bacteria Gram positiva predominante.

Palabras clave: Análisis microbiológico; Leche cruda; Bacterias Gram positivas; Norma Técnica microbiológica; *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Cow's milk is one of the most consumed foods due to its abundant composition of proteins, fatty acids and essential micronutrients. However, these characteristics, combined with the poor hygienic measures in the method of obtaining this product through manual milking; as well as its collection, storage and transportation, make it susceptible to contamination by microorganisms and therefore responsible for gastrointestinal diseases. **Objective.** Identify Gram positive bacteria present in raw cow's milk, obtained by manual milking, from five dairy farms located in the Canton of Chilla in the Province of El Oro, in Ecuador. **Materials and methods.** By random sampling, 20 milk samples were obtained, each of 150 ml, collected from manual milking carried out in five dairy farms. Once the samples were collected, Regulation INEN1 529-2:99 was applied for handling and transportation. Likewise, a microbiological analysis was carried out according to the protocols of the NTE INEN9:2012 and NTE INEN 1529-5:2006 regulations, in the Microbiology and Parasitology Laboratory of the Technical University of Machala. For the detection and identification of Gram-positive bacteria, dilution, characterization, enzymatic biochemical test and Gram staining methods were applied. **Results.** The physicochemical characteristics of density and pH of the samples complied with the Regulations. In all the dairy farms, the presence of turbidity, gas and precipitate was observed in the 1/10, 1/100 and 1/1000 dilutions. Enzymatic tests and microbiological culture identified the presence of *Staphylococcus aureus*. **Conclusions.** The genus *Staphylococcus* species *aureus* was the predominant Gram positive bacteria.

Key words: Microbiological analysis; Raw milk; Gram positive bacteria; Microbiological standards; *Staphylococcus aureus*

RESUMO

O leite de vaca é um dos alimentos mais consumidos devido à sua abundante composição de proteínas, ácidos graxos e micronutrientes essenciais. Contudo, estas características, aliadas às fracas medidas higiénicas no método de obtenção deste produto através da ordenha manual; bem como sua coleta, armazenamento e transporte, tornam-no suscetível à contaminação por microorganismos e, portanto, responsável por doenças gastrointestinais. **Objetivo.** Identificar bactérias Gram positivas presentes no leite de vaca cru, obtido por ordenha manual, de cinco fazendas leiteiras localizadas no Cantão de Chilla, na Província de El Oro, no Equador. **Materiais e métodos.** Por amostragem aleatória foram obtidas 20 amostras de leite, de 150 ml cada, coletadas em ordenhas manuais realizadas em cinco propriedades leiteiras. Uma vez coletadas as amostras, foi aplicada a Norma INEN1 529-2:99 para manuseio e transporte. Da mesma forma, foi realizada uma análise microbiológica de acordo com os protocolos dos regulamentos NTE INEN9:2012 e NTE INEN 1529-5:2006, no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Técnica de Machala. Para detecção e identificação de bactérias Gram-positivas foram aplicados métodos de diluição, caracterização, teste bioquímico enzimático e coloração de Gram. **Resultados.** As características físico-químicas de densidade e pH das amostras atenderam ao Regulamento. Em todas as propriedades leiteiras foi observada presença de turbidez, gases e precipitado nas diluições 1/10, 1/100 e 1/1000. Testes enzimáticos e cultura microbiológica identificaram a presença de *Staphylococcus aureus*. **Conclusões.** O gênero *Staphylococcus* espécie *aureus* foi a bactéria Gram positiva predominante.

Palavras-chave: Análise microbiológica; Leite cru; Bactérias Gram positivas; Padrões microbiológicos; *Staphylococcus aureus*

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), son causadas por la ingestión de microorganismos vivos perjudiciales para la salud, constituyen una de las causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, principalmente en países cuyas economías son más precarias. Estas enfermedades se pueden convertir en un problema de salud pública, ya que generan un impacto negativo en la sociedad y en los sistemas de atención de salud, ocasionando el deterioro de la calidad de vida de la población, la productividad, el comercio y el turismo (1-3).

Las ETAs son generalmente de carácter infeccioso o tóxico causadas por bacterias virus o parásitos que penetran al organismo a través de los alimentos contaminados. Producen diversas dolencias y enfermedades que pueden ir desde manifestaciones gastrointestinales hasta el cáncer (2,4). La contaminación de los alimentos puede darse en cualquier etapa del proceso desde la producción hasta el consumo de los mismos. Se estima que cada año mueren 1,8 millones de personas debido a enfermedades diarreicas atribuidas al consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos patógenos (1, 5-7) En Ecuador el Ministerio de Salud Pública a través de la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, reportó 2207 casos por intoxicación alimentaria, para la semana 11 del año 2021, los cuales en su mayoría fueron reportados en la Provincia de El Oro, con 1253 casos (8).

En consecuencia, es importante vigilar la calidad alimentaria de la leche cruda de vaca; ya que, por ser una sustancia rica en proteínas, lípidos y micronutrientes puede convertirse en un caldo de cultivo idóneo para la multiplicación de microorganismos (1,6). El control de este alimento se rige por la Norma Técnica Ecuatoriana (9), la cual establece los requisitos que se deben cumplir, tanto en la obtención, transporte y conservación; entendiendo por leche cruda como la leche que no ha sufrido tratamiento térmico, salvo el de enfriamiento para su conservación, ni ha tenido modificación alguna en su composición (6,9).

En esta investigación para determinar los parámetros de calidad de la leche cruda, se empleó la Norma INEN 0009:2012 predestinada a la pasteurización. Está norma es empleada únicamente en leche fresca recién recolectada del ordeño, que no ha sido sometida a un proceso térmico. Sin embargo, es permitido emplear enfriamiento para conservar la leche de su descomposición. Dentro de los parámetros de calidad que se pueden medir en la composición de la leche cruda, se destacan los parámetros fisicoquímicos cualitativos como el color, aspecto y olor de la leche, y también están los cuantitativos como temperatura, densidad, pH, acidez y presencia de antibióticos (9, 10).

La leche cruda se caracteriza por ser un producto homogéneo de olor y sabor agradable, de color blanco opalescente, aspecto homogéneo, libre de bacterias y materias extrañas. Los valores

para la densidad a 20°C deben oscilar entre 1028 y 1032 g/cc y el pH entre 6,4 y 6,8. Asimismo, el límite aceptado de concentración de *Staphylococcus aureus* es de 10 Unidades de Formación de Colonias por ml de muestra (10 UFC/ml). Al cumplir con los parámetros establecidos por la normativa (9) del Instituto Ecuatoriano de Normalización, será aceptado como un producto de buena calidad para el consumo humano (11-13).

Con respecto a las medidas que se deben cumplir, la leche debe ser almacenada y conservada a una temperatura de 4°C, con el fin de controlar la proliferación del crecimiento bacteriano. También el acarreo y transporte debe ser en vehículos adecuados, preferiblemente refrigerados, sin tener interrupciones ni paradas innecesarias (9,14,15). Otro aspecto importante que asegura la calidad alimenticia de la leche es la aplicación de las medidas higiénicas en las vaquerías o lugares de ordeño, se pueden mencionar: la limpieza y desinfección de la sala de recolección, el uso de agua potable para la limpieza de equipos y utensilios, esterilización de los recipientes para la recolección y almacenamiento, control de la presencia de insectos como las moscas, uso de barreras físicas, tales como mascarillas, gorros y guantes, por parte de los ordeñadores (14,15-19).

En este orden de ideas, es importante destacar que la falta de higiene por parte del personal que interviene en el ordeño, almacenamiento, transporte o comercialización de la leche puede deteriorar su calidad higiénico sanitaria favoreciendo la contaminación por la presencia de

bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y *Staphylococcus aureus* (14). Por consiguiente, la presencia de microorganismos en la leche cruda además de contaminar y causar daños a nivel de la salud, también provoca grandes pérdidas en las ganaderías lecheras (3,5,20,21).

Las bacterias Gram positivas como el género *Staphylococcus* son los patógenos con mayor índice de ETAs. Los estafilococos, son bacterias de forma esférica, inmóviles, positivas a las pruebas de coagulasa y catalasa, anaerobios facultativos que forman parte de la microbiota natural de la piel, fosas nasales, del tracto urogenital y también del tracto digestivo tanto en el ser humano como en los animales (22,23). Se conoce que este género de bacterias presenta 45 especies y 21 subespecies los cuales se pueden clasificar de acuerdo a dos grupos, los que pueden producir la enzima coagulasa: estafilococos coagulasa positivos (CoPs) como por ejemplo *S. aureus* y los estafilococos coagulasa negativos (CoNS) dentro de los cuales esta *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, y *S. Lugdunensis* (23-26). Comúnmente estas bacterias se cultivan en medios selectivos o diferenciales a una temperatura de 35 a 37°C durante 18 a 24h para garantizar un crecimiento óptimo (24-27).

Entre estos microorganismos el *Staphylococcus aureus* es el que se presenta con mayor prevalencia en la leche; alterando su composición descendiendo su pH entre 4.3 –y 4.5. Por tanto, es considerado como un agente patógeno causante de mastitis bovina, infecciones superficiales y crónicas, y enfermedades gastrointestinales

en seres humanos (15, 22). Por esta razón el aislamiento e identificación del *S. aureus* es de gran interés para la industria láctea en Ecuador, con el fin de prevenir brotes de ETAs, ya que la detección a tiempo en el ambiente, materia prima o producto terminado se convierte en la posibilidad de garantizar un alimento seguro e higiénico y así evitar problemas de salud a la población (20).

Cabe destacar, que en este país la producción lechera representa una fuente de ingresos para casi 1,2 millones de personas. Esto indica que la industria láctea representa alrededor del 4% del PIB Agroalimentario del país, teniendo un gran impacto económico y un alto potencial de exportación (28,29). Entre los 299.000 productores de leche ecuatorianos, un 80% son granjas pequeñas, familiares y solo un 20% granjas medianas y grandes. Apenas 4% de los productores está tecnificado y reporta alta productividad (20). Por tanto, es de importancia mantener la calidad de la leche para asegurar el crecimiento de este sector económico.

Por lo antes planteado la investigación se ejecutó en una muestra de cinco vaquerías ubicadas en el cantón Chilla en la provincia de El Oro en Ecuador, y se trazó como objetivo identificar bacterias patógenas Gram positivas, presentes en la leche cruda de vaca obtenida por ordeño manual; utilizando técnicas enzimáticas y microbiológicas para su aislamiento e identificación.

MÉTODO

De acuerdo al objetivo se clasifica como una investigación descriptiva con un diseño de campo, longitudinal y contemporáneo. La población estuvo constituida por cinco vaquerías ubicadas en el Cantón Chilla en la provincia de El Oro en Ecuador, cada productora de leche se encuentra separada por una distancia mínima de 1000 metros, el total de vacas fue de 41 individuos. Por muestreo aleatorio se obtuvieron 20 muestras de leche, cada una de 150 ml, estas muestras fueron recolectadas del ordeño manual realizado en las vaquerías desde las 5:00 hasta las 7:00 de la mañana, durante los meses de junio y julio, en el año 2023. Una vez recolectadas las muestras, se aplicó la normativa INEN 1 529-2:99 (30) para el manejo y transporte; bajo los mismos estándares, el procesamiento se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología, de la facultad de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala.

Para la detección e identificación de las bacterias Gram positivas se aplicaron métodos de dilución, caracterización, prueba bioquímica enzimática y tinción de Gram. Por consiguiente, se utilizaron los materiales necesarios para la siembra y cultivo de microorganismos; así como también, los equipos para la preparación de las muestras, incubación, detección e identificación de microorganismos.

Procedimiento: Además de los métodos y técnicas empleados para la recolección y transporte de la muestra según la normativa INEN 1 529-2:99, se siguieron los protocolos para el análisis microbiológico según normativa NTE INEN 9:2012 Y NTE INEN 1529-5:2006 (9, 30).

La recolección de las muestras de leche cruda se hizo en recipientes estériles, debidamente rotulados, los cuales se transportaron con temperaturas de 0 a 4°C. Los medios de cultivo utilizados fueron el Caldo Lactosa fabricado por MCDLAB y el Agar Manitol Salado obtenido del Laboratorio Clínico “Dra. Cecilia Valverde”, los cuales fueron preparados de acuerdo a los procedimientos estandarizados. Para la siembra

se utilizó la técnica de aislamiento por banco de cinco diluciones sucesivas, a saber 1/10, 1/100/, 1/1000/, 1/10000 y 1/100000. Cada dilución se sembró en caldo de cultivo de lactosa e incubados a 37°C durante 24 horas (17). Los procedimientos de identificación de los microorganismos fueron tres: Aislamiento de colonias por agotamiento, en cajas de Petri; prueba bioquímica de coagulasa y la tinción de Gram (23, 27,31).

RESULTADO Y DISCUSIÓN

Las características fisicoquímicas de las muestras de leche, de acuerdo a la normativa NTE INEN 9:2012, aluden al pH y la densidad, estos resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de las muestras de leche cruda

pH				
Vaquería	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
1	6,42	6,50	6,63	6,70
2	6,56	6,59	6,41	6,78
3	6,49	6,56	6,53	6,68
4	6,43	6,42	6,59	6,47
5	6,62	6,47	6,51	6,69
Densidad relativa a 20 °C				
Vaquería	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
1	1,029	1,030	1,028	1,031
2	1,028	1,030	1,030	1,031
3	1,029	1,029	1,031	1,028
4	1,030	1,028	1,029	1,031
5	1,028	1,030	1,029	1,029

La Tabla 1 muestra la calidad fisicoquímica de la leche cruda, con respecto al pH y densidad, todas las muestras en las respectivas vaquerías presentan un pH entre 6,42 a 6,78 y una densidad entre 1,028 a 1,031. Lo que significa que la calidad fisicoquímica de la leche cruda de vaca se encuentra dentro de los límites establecidos por la normativa NTE INEN 9:2012. Al respecto, Brousett (32) y López y Barriga (33), mencionan que cuando el pH de la leche está fuera de los rangos permitidos por la normativa, es por efecto de contaminación microbiana, dado que estos microorganismos transforman la lactosa en ácido láctico, bajando los valores del pH. También

puede ocurrir un cambio en el pH por mantener el producto a temperaturas superiores a los 20°C. Esto no quiere decir que las muestras de leche no pudieran estar contaminadas, sino que el tiempo de reproducción de las bacterias no ha transcurrido.

Las características cualitativas de las diluciones de las muestras de leche son el olor, la turbidez, la producción de gas y la presencia de un precipitado. Así mismo el color, la consistencia y el borde de las colonias son características empleadas para la identificación de las colonias de microorganismos. Estas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características cualitativas por dilución de muestra.

Vaquería 1							
	Olor	Diluciones Turbidez	Gas	Precipitado	Color	Colonias Consistencia	Borde
1/10	Característico	Alto	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/100	Característico	Alto	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/1000	Característico	Medio	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/10000	Característico	Bajo	Ausencia	Negativo	Sin datos	Sin datos	Sin datos
1/100000	Característico	Bajo	Ausencia	Negativo	Sin datos	Sin datos	Sin datos
Vaquería 2							
	Olor	Diluciones Turbidez	Gas	Precipitado	Color	Colonias Consistencia	Borde
1/10	Característico	Alto	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/100	Característico	Alto	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/1000	Característico	Medio	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/10000	Característico	Bajo	Ausencia	Negativo	Sin datos	Sin datos	Sin datos
1/100000	Característico	Bajo	Ausencia	Negativo	Sin datos	Sin datos	Sin datos

Vaquería 3							
	Diluciones					Colonias	
	Color	Turbidez	Gas	Precipitado	Color	Consistencia	Borde
1/10	Característico	Alto	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/100	Característico	Medio	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/1000	Característico	Medio	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/10000	Característico	Medio	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/100000	Característico	Bajo	Ausencia	Negativo	Sin datos	Sin datos	Sin datos

Vaquería 4							
	Diluciones					Colonias	
	Olor	Turbidez	Gas	Precipitado	Color	Consistencia	Borde
1/10	Característico	Alto	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/100	Característico	Alto	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/1000	Característico	Alto	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/10000	Característico	Alto	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/100000	Característico	Medio	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso

Vaquería 5							
	Diluciones					Colonias	
	Olor	Turbidez	Gas	Precipitado	Color	Consistencia	Borde
1/10	Característico	Alto	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/100	Característico	Medio	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/1000	Característico	Medio	Presencia	Positivo	Amarillo con halo amarillo	Untuoso	Liso
1/10000	Característico	Bajo	Ausencia	Negativo	Sin datos	Sin datos	Sin datos
1/100000	Característico	Bajo	Ausencia	Negativo	Sin datos	Sin datos	Sin datos

En la Tabla 2 se muestra que en todas las vaquerías se observó presencia de turbidez, gas y precipitado en las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000; así mismo, en sus colonias presentaron un color amarillo con halo de este color, consistencia untuosa y borde liso. De forma específica en las vaquerías 1, 2 y 5, fue positiva la presencia de microorganismos en las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000, y negativa en las restantes. Las muestras de la vaquería 4, fueron positivas a la presencia

de microorganismos hasta la dilución 1/10000 y la vaquería 3 resultó positivo en todas las diluciones desde 1/10 hasta 1/100000. Esto significa que existe mayor concentración de microorganismos en las muestras de leche cruda proveniente de la vaquería 3, ya que se observó el desarrollo de las colonias en todas las diluciones. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes con el tipo de microorganismo.

En este orden de ideas Ramírez et al. (34) refieren que los medios de cultivos tanto líquidos como sólidos, son un conjunto de nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos. De acuerdo a la concentración del inóculo, el desarrollo de las bacterias va a aumentar o disminuir de manera directamente proporcional; a mayor concentración mayor será el crecimiento bacteriano y si la concentración es baja tendrá

un menor crecimiento. Las diluciones para este estudio se realizaron en caldo lactosa, las características que deberían presentar son turbidez, precipitado y gas, para indicar el crecimiento de microorganismos, pero no se puede especificar la bacteria que se está desarrollando ya que es una prueba presuntiva (Ver Figura 1A). En la Figura 1B el tubo presenta el líquido transparente libre de crecimiento bacteriano.

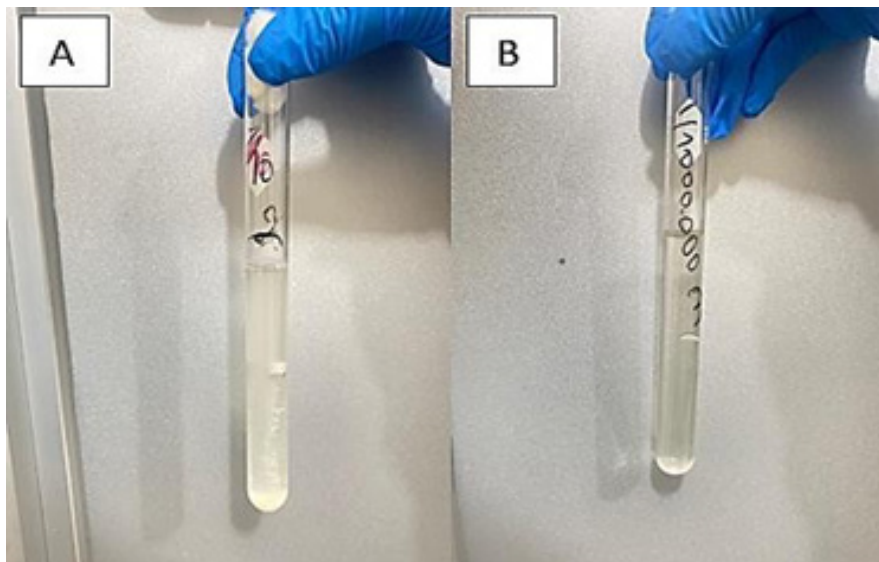


Figura 1. Características cualitativas de las diluciones 1/10 y 1/100000 en la vaquería 2.

Una vez realizadas las lecturas de las características cualitativas en las cinco diluciones por cada muestra, se procedió al conteo de colonias aisladas en medio de cultivo agar manitol

salado, el cual se utilizó como un medio selectivo para el aislamiento de estafilococos patógenos, especialmente el *Staphylococcus aureus*, los resultados en la Figura 2.

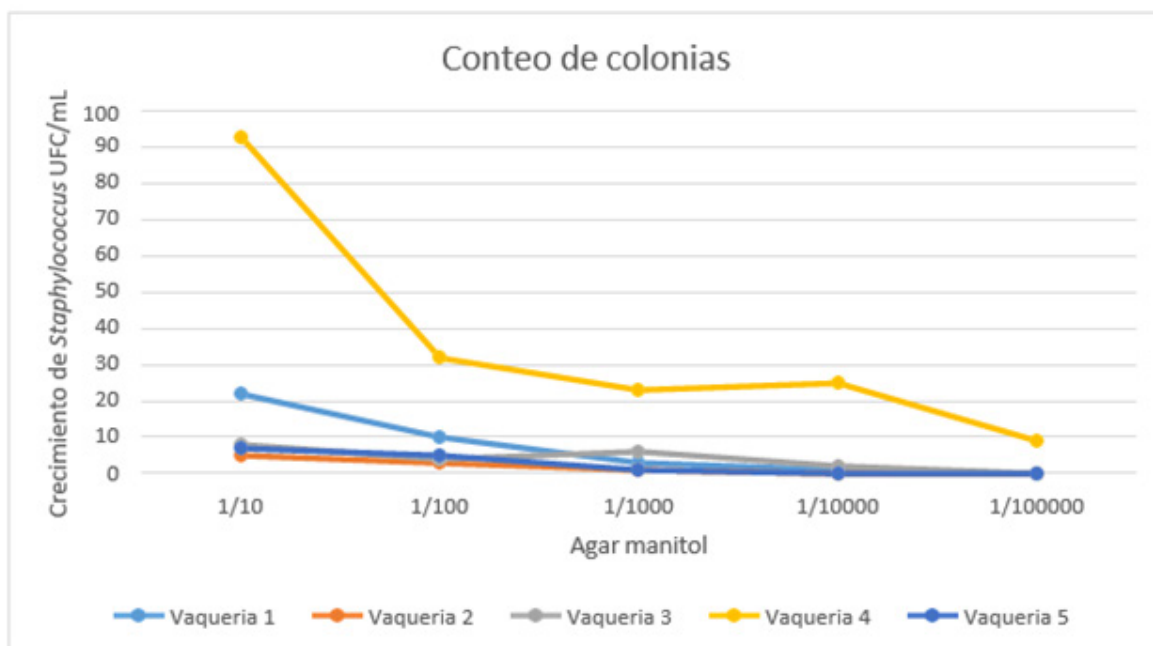


Figura 2. Desarrollo de las Unidades de Formación de Colonias.

La siembra se realizó por duplicado a partir de las cinco diluciones para las 20 muestras de leche. En la Figura 2 se observa que las muestras provenientes de la vaquería 4 presentan mayor cantidad de Unidades Formadoras de Colonias de *S. aureus* por mililitro de muestra (UFC/ml). En la dilución 1/10 el recuento de UFC fue de 98 y en las vaquerías 1, 2, 3 y 5 no sobrepasaron de las 45 UFC. En la dilución 1/100000, las muestras de la vaquería 4 fueron las únicas en las cuales aparecieron 38 colonias, esto en comparación con las muestras provenientes de las otras vaquerías, las cuales no desarrollaron colonias en esa dilución. El recuento de organismos mesófilicos es una medida de las condiciones de higiene en la producción de leche, donde el valor de 10.000 UFC/ml es considerado para indicar que la leche es de buena calidad, por

encima de estos valores no es recomendable el procesamiento ni el consumo del producto (9).

Para el cultivo de los microorganismos se prepararon suspensiones con solución salina estéril. Se realizó la siembra por estriado en agar manitol salado, como el medio selectivo y diferencial para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*, las cápsulas de Petri fueron incubadas a 27 °C durante 24 horas. En la figura 3 se evidencian las colonias de color amarillo en el lado A y el agar limpio sin colonias en el lado B. Al respecto, Durán Vila et al. (35), reportan que cuando existe el desarrollo de colonias de *S. aureus*, es porque este tipo de bacterias son fermentadoras del manitol y por ende va a producir ácido en el medio de cultivo, permitiendo la formación del halo de color amarillo alrededor de las colonias.

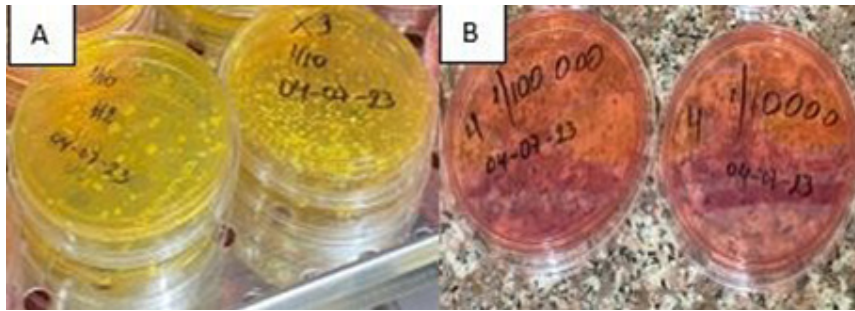


Figura 3. Siembra en agar manitol. A: desarrollo de colonias de *S. aureus* B: Ausencia.

El recuento elevado de *S. aureus* en las muestras de la vaquería 4 pudo tener diversos factores contaminantes como la presencia de lodo, heces del ganado, inadecuado empleo del equipo de bioseguridad por parte de los ordeñadores, calidad del agua para el lavado de utensilios y desinfección de la ubre bovina; sin embargo, no se logró determinar cuál o cuáles fueron los causantes. De acuerdo a la normativa NTE INEN 9, el límite aceptado de concentración de *S. aureus* es de 10 UFC/ml, por consiguiente, las muestras de leche de las vaquerías 4 y 1 no son aptas para su procesamiento y consumo.

Estos resultados coinciden con los reportados por la investigación de Saltos Solórzano et al. (36) en la cual el análisis de las muestras de leche fue positivo para *Staphylococcus aureus*, con un conteo de colonias entre 120 y 13 UFC/ml, en las diferentes diluciones para la siembra. Concluyendo que todas las muestras estuvieron fuera del rango de aceptación del producto de acuerdo a la Norma NTE INEN 15. Para reducir la contaminación por *S. aureus* los investigadores implementaron

Procedimientos Operacionales Estandarizados (POE) y Procedimientos Operacionales Estandarizados de Sanitación (POES) como prácticas para prevenir la contaminación de la leche, estos redujeron notoriamente la presencia de *Staphylococcus aureus*.

Asimismo, diferentes investigaciones de análisis microbiológico de leche cruda obtenida por ordeño manual, como las de Martínez-Vasallo et al., (18) Albuja Landi et al., (19), Pacha et al., (24) y Jaramillo Colorado et al. (37), coinciden en reportar la presencia de *Staphylococcus aureus*, superiores a 10 UFC/ml en las primeras tres diluciones de las muestras. Como causas de la contaminación por este microorganismo mencionan las malas prácticas de higiene durante la rutina de ordeño, uso inadecuado de barreras físicas como la mascarilla y guantes, y carencias en la desinfección en el lugar de ordeño.

A continuación, se reporta el resultado del tamaño desarrollado por las colonias de *S. aureus* en las diferentes diluciones de las muestras como otra característica cuantitativa, Figura 4.

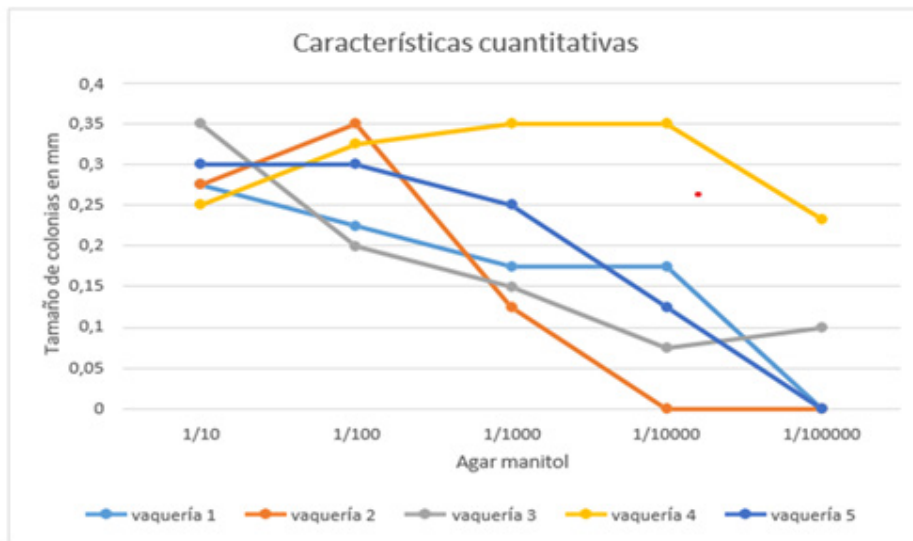


Figura 4. Tamaño de las colonias de *S. aureus*.

La Figura 4 permite determinar que las colonias de *Staphylococcus aureus* presentaron ciertas diferencias en cuanto al tamaño, el máximo fue de 0,35 mm y mínimo de 0,075 mm. El tamaño de las colonias puede ser afectado por el tiempo de incubación y la concentración bacteriana en la siembra (23, 26). Es decir que, si el asa de platino no estuvo tan cargada de muestra,

al momento de hacer el estriado en el medio de cultivo no iba a crecer de la misma manera que una siembra bien cargada. Con el objetivo de confirmar el tipo de especie de *Staphylococcus* aislado en el medio de cultivo, se realizó la prueba de coagulasa (17, 23), los resultados se pueden observar en la Figura 5.

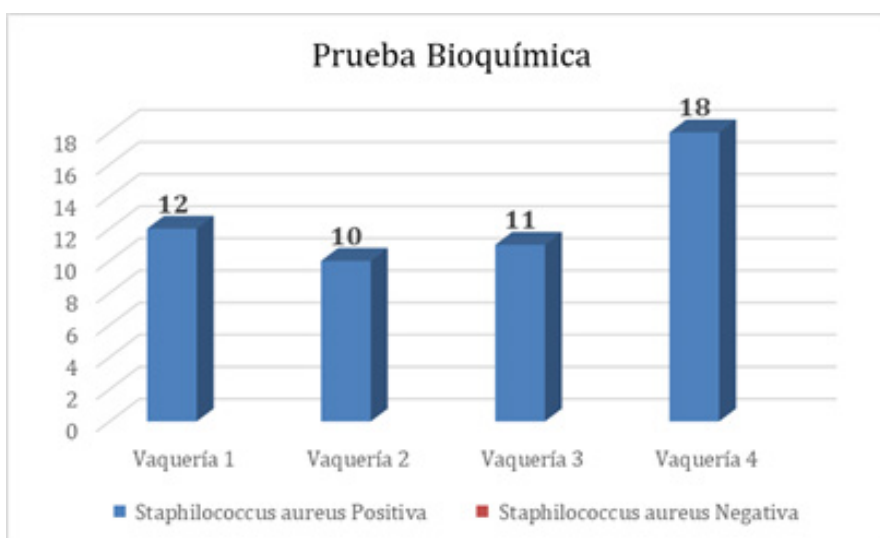
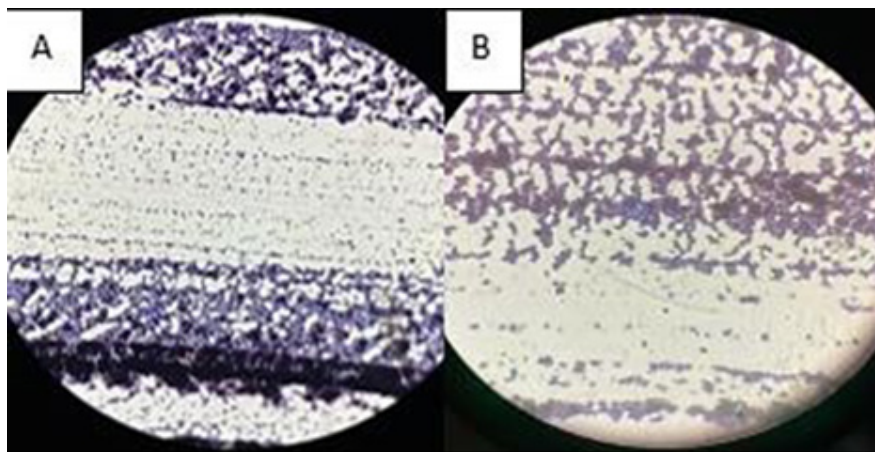


Figura 5. Prueba Bioquímica de Coagulasa.

La Figura 5 evidencia resultados positivos a la prueba de Coagulasa, en todas las muestras, las colonias aisladas en agar manitol fueron características de *Staphylococcus aureus*. Al respecto Pasachova Garzón et al., (22) en su investigación mencionan que para confirmar el tipo de *Staphylococcus* que creció en agar manitol, se debe realizar la prueba bioquímica de coagulasa, la cual con un resultado positivo se comprueba que la bacteria aislada pertenece a la género *Staphylococcus* y a la especie *aureus*.

Esto se debe a la producción de la enzima estafilocoagulasa que actúa como un agente activo en la coagulación que convierte el fibrinógeno en fibrina. Esta prueba distingue la bacteria *S. aureus* de las otras especies como lo son la *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* y *S. saprophyticus* ya que estas bacterias al no producir esta enzima, son denominadas estafilococos coagulasa negativos.

Finalmente, se realizó la tinción de Gram para corroborar el género y especie de la bacteria, resultados que se ilustran en la Figura 6.



La Figura 6 muestra una tinción de Gram positiva, ya que las bacterias retuvieron el color violeta. La parte A es una vista microscópica con un aumento de 400X y la parte B de 1000X. Esta técnica permitió confirmar la presencia de *Staphylococcus aureus* en las muestras de estudio. Al respecto Cervantes-García et al. (25) indican que si las bacterias conservan la coloración cristal violeta se denominan Gram positivas y si la pierden se denominan Gram negativas; la tinción de Gram se debe realizar con cultivos frescos no mayor a las

24 h, puesto que un cultivo pasado este tiempo hace que las bacterias pierdan la capacidad de retener el colorante primario.

De acuerdo a los resultados obtenidos las muestras de la leche cruda presentan recuentos elevados de *S. aureus*, por lo tanto, no cumplen con la normativa NTE INEN9:2015 (38). El consumo de este producto puede provocar daños en la salud del consumidor. Al respecto, Jaramillo Colorado et al (37) manifiestan que el *S. aureus* es una bacteria patogénica causante de intoxicación

alimentaria y al consumir una leche contaminada por este tipo de bacteria traerá consigo problemas gastrointestinales manifestados como dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea y deshidratación en casos severos. Mientras que en casos más graves se puede presentar síntomas tales como cefalea y colapso intestinal.

CONCLUSIÓN

Se identificó en las muestras de leche cruda obtenida por ordeño manual, provenientes de las vaquerías del Cantón Chilla la presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus* de forma predominante con respecto a otras bacterias. En una de las vaquerías se obtuvo una carga microbiana muy elevada, lo que indica que la leche no tiene buena calidad higiénica en relación a las Normas Técnicas ecuatorianas. Las causas de la contaminación de la leche cruda de vaca con *S. aureus* pueden ser las inadecuadas prácticas de ordeño y las escasas condiciones higiénicas en los ambientes de las cinco unidades productoras de leche y en los utensilios de recolección y transporte.

CONFLICTO DE INTERESES. Los autores declaran que no existe conflicto de intereses para la publicación del presente artículo científico.

FINANCIAMIENTO. Los autores declaran que no recibieron financiamiento

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades de transmisión alimentaria. 2022. https://www.who.int/es/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1
2. Reyna S, Arteaga J. Riesgos de contaminación química en leche y sus derivados. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. 2022; 36(2), 10–13. <https://doi.org/10.17163/lgr.n36.2022.10>
3. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. 2009 <https://acortar.link/UvDa5I>
4. Villamil R, Robelto G, Mendoza M, Guzmán M, Cortés L, Méndez C, Giha V. Desarrollo de productos lácteos funcionales y sus implicaciones en la salud. *Rev. chil. Nutr.* 2020; 47(6): 2–11. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182020000601018>
5. Aguilera A, Urbano, E, Jaimes P. Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria. *Cienc. Agric.* 2014; 11(2):3–12. <https://acortar.link/koPvwl>
6. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *Milk Facts*. 2013. <https://acortar.link/sGiTjJ>
7. Guarín C, Restrepo D. Sobre la relación entre el consumo de leche cruda y la salud humana: una revisión sistemática. *Rev cubana Aliment Nutr.* 2020; 30(2):2–23. <http://www.sciencedirect.com/>
8. Ministerio de Salud Pública de Ecuador. Subsecretaría Nacional de Vigilancia de la Salud Pública. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Enfermedades transmitidas por agua y alimentos otras intoxicaciones alimentarias. Ecuador, Semana Epidemiológica 11/2021 <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/03/Etas-SE-11.pdf>
9. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Norma técnica ecuatoriana 0009 NTE INEN 9:2012 Quinta revisión 2012-01. Leche cruda Requisitos; 2012. <https://acortar.link/O7oztY>
10. Guevara-Freire D, Montero-Recalde M, Rodríguez A, Valle L, Avilés-Esquivel D. Calidad de leche acopiada de pequeñas ganaderías de Cotopaxi, Ecuador. *Rev Invest Vet del Perú*. 2019; 30(1):3–9. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15679>

11. Vallejo C, Díaz R, Morales W, Godoy V, Calderón N, Cegido J. Calidad físico-química e higiénica sanitaria de la leche en sistemas de producción doble propósito, Manabí- Ecuador. *Rev Invest Tal.* 2018; 5(1):2–10. <https://acortar.link/WRatvc>
12. Álvarez-Figueroa M, Pineda-Castro M, Chacón-Villalobos A, Cubero-Castillo E. Características fisicoquímicas y sensoriales de leches caprina y bovina enteras, descremadas y deslactosadas. *Agron. Mesoam.* 2022; 33(2): 5–20. <https://doi.org/10.15517/am.v33i2.47039>
13. Delgado P, Parisaca V, Quispe I, Delgado E, Aduviri M. Evaluación de la calidad de la leche cruda bovina (*Bos taurus*) en la Comunidad Mazo Cruz del Departamento de la Paz-Bolivia. *J. Selva Andina Anim. Sci.* 2016; 3(1): 4–6. <https://acortar.link/FUUgCF>
14. Valdivia A, Rubio Y, Beruvides A. Calidad higiénico-sanitaria de la leche, una prioridad para los productores. *Rev. Prod. Anim.* 2021; 33(2): 6–13. <https://acortar.link/WebBOM>
15. Iñiguez L, Valencia A, Anaya L, Anzaldo R, Pliego J, Reyes, Méndez MD. Leche cruda de vaca destinada a la elaboración de productos artesanales: calidad microbiológica y fisicoquímica. *Rev Cienc Biol Sal, Biotecnia.* 2023; 24(3):2–7. <https://acortar.link/KaalH4>
16. Gwandu S, Nonga H, Mdegela R, Katakweba A, Suleiman T, Ryoba R. Evaluación de la calidad de la leche cruda de vaca en pequeñas explotaciones lecheras de la isla de Pemba en Zanzíbar (Tanzania). *Med. Vet. Int.* 2018; 11–17. <https://doi.org/10.1155/2018/1031726>
17. Jurado H, Quitiaquez D, Muñoz L. Valoración de calidad composicional, sanitaria, y microbiológica de leche cruda en diferentes tercios de lactancia. *Biot Sect Agropec y Agroin.* 2021; 19(2): 147–157. <https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n2.2021.1675>
18. Martínez A, Villoch A, Ribot A, Ponce P. Diagnóstico de Buenas Prácticas Lecheras en una cooperativa de producción. *Rev Salud Anim.* 2014; 36(1): 3–5. <https://acortar.link/VTt1Fm>
19. Albuja A, Escobar S, Andueza F. Calidad bacteriológica de la leche cruda bovina almacenada en el centro de acopio Mocha. Tungurahua. Ecuador. 2021. *Siembra;* 8(2): 2–12. <https://doi.org/10.29166/siembra.v8i2.3176>
20. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Programas y servicios. <http://www.agricultura.gob.ec/programas-y-servicios/>
21. Montero P. Calidad y seguridad de la leche cruda de vaca producida en Panamá. Ver. *I+D Tecn.* 2022; 18(1): 5–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.33412/idt.v18.1.3480>
22. Pasachova J, Ramírez S, Munoz L. (2019). *Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular.* NOVA. 2019; 17(32): 25-38. <https://doi.org/10.25058/24629448.36312>
23. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3a ed. Uruguay: Editorial Médica Panamericana S.A; 2003. <https://acortar.link/q0UdGW>
24. Pacha P, Munoz M, Gonzáles G, San Martín I, Quezada M, Aguayo A, Bello H, Latorre AA. Molecular diversity of *Staphylococcus aureus* and the role of milking equipment adherences or biofilm as a source for bulk tank milk contamination. *J Dairy Sci.* 2021; 104(3): 3522-3531. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19121>
25. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Mex Patol Clin Med Lab.* 2014; 61(1): 4–13. <https://acortar.link/4sl5Zm>
26. Diana L, Ciuffo C, Musto H. Identificación y caracterización de *Staphylococcus* resistentes a metilicina aislados de perros. *Veterinaria.* 2019; 55(212):2–7. <https://acortar.link/AS2aKP>
27. Vargas T, Kuno A. Morfología bacteriana. *Rev Act Clín.* 2014; 49(2): 4–6. <https://acortar.link/P5dXnu>
28. Ministerio de Agricultura y Ganadería. El Nuevo Ecuador. Chilla tiene el primer centro de acopio de leche. <https://acortar.link/szRC3P>
29. Ionita E. La producción de leche en Ecuador. *Vet Dig,* 2022. <https://acortar.link/1XHRzN>
30. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Norma Técnica Ecuatoriana I529-2 NTE INEN I 529-2. Acuerdo No. 25 Toma, envío y preparación de muestra para el análisis microbiológico de los

alimentos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Base de datos FAOLEX; 2017. <https://acortar.link/EA1o1O>

31. Manjarrez A, Díaz S, Salazar F, Valladares B, Gutiérrez A, Barbabosa A. Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México. Rev. Mex. de Cienc. Pecuarias. 2012; 3(2): 4–10. <https://acortar.link/qCCrnA>

32. Brousett M, Torres A, Chambi A, Mamani B, Gutiérrez H. Calidad fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de leche cruda en las cuencas ganaderas de la región Puno-Perú. Scien. Agropec. 2015; 6(3): 6–12. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.03.03>

33. López Á, Barriga D. La leche. Composición y características. Andalucía, España: SERVIFAPA Junta de Andalucía Plataforma de Asesoramiento y Transferencia de Conocimiento Agrario y Pesquero en Andalucía. 2016. <https://acortar.link/Fxp8Dt>

34. Ramírez J, Parra J, Álvarez Aldana A. Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos. 2017. Rev. Mente Joven; 6: 1–7. <https://acortar.link/olyaOM>

35. Durán A, Zhurbenko R, Viera D. Propuesta de una modificación en la formulación del medio agar manitol salado utilizado en el aislamiento de estafilococos de importancia clínica. Rev cubana Med Trop. 2004; 56(3):1– 6. <https://acortar.link/yEJUMB>

36. Saltos J, Márquez Y, López A, Martínez J, Guerrero D. La implementación de procedimientos estandarizados en la prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos. Conteo microbiológico de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos. Rev. Médica electron. 2018; 40(2): 371-382. <https://acortar.link/prHp93>

37. Jaramillo J, Echeverri J, Olivera M, López A. Microorganismos aislados en cultivo bacteriológico de muestras de leche de vacas Holstein clínicamente sanas. Med Vet Zootec. 2018; 13(1): 31–41. <https://doi.org/10.21615/cesmvz.13.1.3>

38. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9. Leche Cruda, Requisitos. 2015. <https://acortar.link/liMBfV>