



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“VALIDACIÓN DE UN SOFTWARE ELECTRÓNICO PARA EL
CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS Y
DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD BACTERIANA EN
MUESTRAS DE LECHE CRUDA.”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: MARÍA JOSÉ SANTANDER CORONEL

DIRECTORA: Dra. MARÍA JANNETH GALLEGOS NÚÑEZ PhD.

Riobamba-Ecuador

2021

©2021, María José Santander Coronel

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, María José Santander Coronel, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 17 de septiembre de 2021



María José Santander Coronel

030229275-0

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: el Trabajo de Titulación: Tipo: Trabajo Experimental, “**VALIDACIÓN DE UN SOFTWARE ELECTRÓNICO PARA EL CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS Y DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD BACTERIANA EN MUESTRAS DE LECHE CRUDA.**”, realizado por la señorita: **MARÍA JOSÉ SANTANDER CORONEL**, ha sido minuciosamente revisado por los miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación. El mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Carlos Pilamunga Capus PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: CARLOS PILAMUNGA	2021/09/07
Dra. María Janneth Gallegos Núñez PhD. DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	 Firmado electrónicamente por: JANNETH MARIA GALLEGOS NUNEZ	2021/09/07
BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla MSc. MIEMBRO DEL TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: GISELA ALEXANDRA PILCO BONILLA	2021/09/07

DEDICATORIA

Mi Trabajo de Titulación lo dedico:

A mis padres, a ellos mi mayor agradecimiento, sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

Sin importar la distancia que nos separa, siempre me han apoyado en cada paso que he dado.

A mi abuelita Lía, que ha sido como mi madre. Físicamente ahora no está, pero desde el cielo sé que siempre guía mis pasos.

A mi hija, por ser el motor que me impulsa cada día para salir adelante.

A mis tías y primas, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, apoyándome en cada momento.

María José

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por mantenerme con vida y poder así cumplir esta meta tan importante.

Gracias a mi familia por su apoyo brindado en cada etapa de mi vida.

Gracias a mis amigas Evelyn, Sara, Gaby y Marina, por estar siempre presentes en mis triunfos y en mis fracasos, brindándome consejos y palabras de aliento.

Gracias a todos los docentes de la carrera de Bioquímica y Farmacia por todas sus enseñanzas.

Un agradecimiento especial a la Dra. Janneth Gallegos, por ser el pilar fundamental para la realización práctica de mi tesis, gracias por sus conocimientos impartidos.

María José

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1. Antecedentes.....	5
1.2. Validación.....	6
1.2.1. Métodos analíticos.....	6
1.2.1.1. Clasificación de métodos analíticos.....	6
1.2.2. Validación de un método alternativo.....	8
1.2.2.1. Validación de pruebas cualitativas para microorganismos.....	8
1.2.2.2. Validación de pruebas cuantitativas para microorganismos.....	8
1.2.3. Parámetros de validación.....	9
1.2.4. Esquema de un procedimiento de validación de un método microbiológico.....	9
1.2.4.1. Identificación del problema analítico.....	10
1.2.4.2. Planificación de las acciones.....	10
1.2.4.3. Validación y evaluación de los resultados.....	10
1.2.4.4. Informe de validación.....	10
1.3. Leche cruda.....	11
1.3.1. Generalidades.....	11
1.3.2. Características organolépticas.....	13
1.3.2.1. Color.....	13
1.3.2.2. Olor.....	13
1.3.2.3. Sabor.....	13
1.3.2.4. Aspecto.....	13
1.3.3. Composición físicoquímica.....	14
1.3.4. Calidad microbiológica.....	15
1.3.4.1. Contaminantes microbiológicos.....	16

1.3.4.2.	<i>Indicadores microbiológicos</i>	17
1.3.4.3.	<i>Fuentes de contaminación de la leche cruda</i>	18
1.3.4.4.	<i>Riesgos para la salud pública</i>	19
1.4.	Recuento bacteriano y obtención de aislados	20
1.4.1.	<i>Métodos convencionales para la cuantificación de microorganismos</i>	20
1.4.1.1.	<i>Métodos de recuento en placa</i>	20
1.4.2.	<i>Métodos alternativos para el recuento de UFC</i>	22
1.4.2.1.	<i>Conteo automatizado de UFC</i>	22
1.4.3.	<i>Software electrónico para el conteo de UFC</i>	22
1.4.3.1.	<i>Software para contar UFC</i>	22
1.4.3.2.	<i>Aplicaciones para conteo de colonias en el laboratorio</i>	23
1.5.	Sensibilidad antimicrobiana	25
1.5.1.	<i>Estandarización</i>	26
1.5.2.	<i>Método de Kirby-Bauer</i>	26
1.5.3.	<i>Control de calidad</i>	28

CAPÍTULO II

2.	METODOLOGÍA	29
2.1.	Tipo de investigación	29
2.2.	Diseño de la investigación	29
2.3.	Localización del Estudio	29
2.4.	Población de estudio	30
2.5.	Tamaño de muestra	30
2.6.	Método de muestreo	30
2.7.	Selección de la muestra	30
2.8.	Materiales, Equipos y Reactivos	31
2.9.	Recolección de datos	31
2.10.	Métodos	32
2.11.	Análisis de datos	35
2.12.	Análisis Estadístico	37

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS y DISCUSIÓN	38
3.1.	Resultados del Conteo Manual VS el conteo mediante Software	38
	CONCLUSIONES.....	50
	RECOMENDACIONES.....	51
	GLOSARIO	
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Parámetros de validación de pruebas cuantitativas y cualitativas.....	9
Tabla 2-1:	Sustancias Extrañas incorporadas en la leche cruda.....	12
Tabla 3-1:	Composición fisicoquímica de la leche cruda de vaca	14
Tabla 4-1:	Límites de residuos de medicamentos veterinarios máximos permitidos para muestras de leche de vaca.....	15
Tabla 5-1:	Requisitos microbiológicos de la leche cruda	16
Tabla 6-1:	Principales bacterias involucradas en ETA en muestras de leche.....	17
Tabla 7-1:	Requisitos microbiológicos de la leche cruda tomada en hato	17
Tabla 8-1:	Categoría de interpretación de resistencia bacteriana.....	27
Tabla 9-1:	Estándar de diámetro de halos de inhibición y puntos de corte (CIM) para <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Enterobacterias</i> , según los datos de NCCLS.....	28
Tabla 1-2:	Equipos, materiales y reactivos.....	31
Tabla 1-3:	Resultados del conteo de UFC en muestras de leche cruda.....	38
Tabla 2-3:	Resultados del antibiograma manual y software en muestra de leche cruda para <i>S. aureus</i>	44
Tabla 3-3:	Porcentaje de sensibilidad y resistencia bacteriana de <i>S. aureus</i>	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Algoritmo de validación	11
Figura 2-1:	Siembra a profundidad	21
Figura 3-1:	Métodos de siembra	22
Figura 4-1:	APD COLONY COUNTER plano directo de agar.....	24
Figura 5-1:	MEDIX GRAPH cuantificación en placa.....	25

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-2: Proceso de validación de software electrónico	35
Gráfico 2-2: Proceso para la purificación de colonias	36
Gráfico 1-3: Porcentajes de sensibilidad y resistencia bacteriana.....	49

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: PREPARACIÓN DE AGARES

ANEXO B: CARACTERIZACIÓN DE *S. aureus*

ANEXO C: RECuento DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

ANEXO D: SENSIBILIDAD BACTERIANA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Apps	Aplicaciones electrónicas
BPM	Buenas prácticas de manufactura
CBM	Concentración mínima bactericida
CIM	Concentración mínima inhibitoria
E_{det}	Error determinado
ETA	Enfermedades Transmisibles por Alimentos
g	gramos
h	horas
H	Humedad
IEC	Comisión Electrotécnica Internacional
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
ISO	Organización Internacional de Normalización
Max	Máximo
MH	Mueller Hinton
Min	Mínima
mL	mililitros
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NICE	Integrated Colony Enumerator
NMP	Número más Probable
PCH	Prácticas correctas de higiene
pH	Potencial hidrógeno
RSD	Desviación estándar relativa
S	Desviación estándar
S²	Varianza
SVA	Sistema de visión artificial
μ	Valor aceptado
UFC	Unidad formadora de colonias
□	Media

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar un software de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, para la lectura de unidades formadoras de colonias (UFC) y halos de inhibición en cultivos microbianos, con el fin de cumplir el protocolo pertinente de la evaluación de aerobios mesófilos en leche cruda y la sensibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*. Los aerobios mesófilos se determinaron en 18 muestras de leche cruda comercializada en tres mercados de Riobamba - Chimborazo, mediante la técnica de extensión en superficie. Para la sensibilidad antimicrobiana se empleó el método de Kirby-Bauer, sobre aislados de *S. aureus* en Agar Baird Parker. La evaluación del software no se cumplió debido a su inhabilitación para la lectura de las placas de cultivos *in vitro* “reales”, aunque el software se probó previamente con imágenes de placas y algunas placas de cultivo. Sin embargo, la lectura manual de los resultados indicó que el 28% (5/18) de las leches examinadas superan el límite de la normativa ecuatoriana 1.5×10^6 UFC/mL de aerobios mesófilos, el 72% (13/18) se encuentran dentro de los límites permisibles con valores entre 4×10^5 y 6.9×10^6 UFC/mL, sin descartar la actividad de inhibidores bacterianos. *S. aureus*, en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana demostró sensibilidad en un 100 % frente a Oxacilina, Ampicilina, Eritromicina, Tetraciclina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Rifampicina, mientras que un aislado fue intermedio frente a Vancomicina y el 100% de los aislados fueron resistentes a Ceftazidimida, representando un reservorio para la transmisión horizontal de resistencia. Se concluye que el software amerita una revisión exhaustiva a fin de que cumpla con su uso previsto. Además, el expendio de leche cruda revela problemas de contaminación poniendo en riesgo la salud pública. Se recomienda una investigación desde el momento del ordeño hasta la comercialización de la leche.

Palabras clave: <UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)>, <SENSIBILIDAD BACTERIANA>, <SOFTWARE ELECTRÓNICO “HOME MADE”>, <VALIDACIÓN>, <LECHE CRUDA>, < CULTIVOS MICROBIANOS>.

LEONARDO
FABIO MEDINA
NUSTE

Firmado digitalmente
por LEONARDO FABIO
MEDINA NUSTE
Fecha: 2021.11.24
11:20:54 -05'00'



2149-DBRA-UTP-2021

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate a software of the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo for the reading of colony-forming units (CFUs) and inhibition halos in microbial cultures, in order to comply with the appropriate protocol for the evaluation of mesophilic aerobes in raw milk and the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus*. Mesophilic aerobes were determined in 18 samples of raw milk sold in three markets of Riobamba - Chimborazo, using the spread plate method. For antimicrobial susceptibility, the Kirby-Bauer method was used on *S. aureus* isolates in Baird Parker Agar. The software evaluation was not achieved due to its inability to read "real" *in vitro* culture plates, although the software was previously tested with plate imaging and some culture plates. However, manual reading of the results indicated that 28% (5/18) of the examined milk samples exceed the limit of the Ecuadorian regulation 1.5×10^6 CFU / mL of mesophilic aerobes, 72% (13/18) are found within the permissible limits with values between 4×10^5 and 6.9×10^6 CFU/mL, without ruling out the activity of bacterial inhibitors. *S. aureus*, in the antimicrobial susceptibility test, showed 100% susceptibility against Oxacillin, Ampicillin, Erythromycin, Tetracycline, Gentamicin, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Rifampicin, while one isolate was intermediate against Vancomycin and 100% of the isolates were resistant to Ceftazidimide, representing a reservoir for horizontal resistance transmission. It is concluded that the software deserves further review in order to comply with its intended use. In addition, sale of raw milk reveals contamination problems putting public health at risk. It is recommended to carry out an investigation from the moment of milking to the commercialization of the milk.

Keywords: <COLONY FORMING UNITS (CFU)>, <BACTERIAL SENSITIVITY>, <“HOME MADE” ELECTRONIC SOFTWARE>, <VALIDATION>, <RAW MILK>, <MICROBIAL CULTURES>.

EDISON
HERNAN
SALAZAR
CALDER
ON

Firmado
digitalmente
por EDISON
HERNAN
SALAZAR
CALDERON
Fecha:
2021.11.30
17:51:19 -05'00'

INTRODUCCIÓN

El control microbiológico forma parte del control de calidad de los productos destinados para el consumo, puesto que los microorganismos son omnipresentes y se encuentran desarrollando diferentes papeles en la actividad humana, participando de manera benéfica o perjudicial, (Sánchez et al., 2017, p.87). La evaluación de la inocuidad y calidad de leche cruda es muy importante llevarla a cabo, debido a , aporta vitaminas y energía para mantenernos activos y realizar las diferentes actividades cotidianas (Sánchez et al., 2017, p.19).

La calidad e inocuidad de la leche comercial y los derivados lácteos dependen exclusivamente de las condiciones y estado de la materia prima proveniente de las diferentes zonas de producción, en donde varían las condiciones de conservación, manipulación y transporte del producto hasta el destino final, por lo tanto, la calidad del producto recibido por el consumidor dependerá del control que se efectuó sobre la leche cruda (La Universidad del Zulia, 2003, p.23).

El consumo de un producto que no cumpla con los requisitos mínimos de calidad, conlleva un sinnúmero de problemas para el estado de salud del consumidor, razón por la cual, la realización de pruebas y análisis de laboratorio de los productos involucrados, se ha convertido en un factor vital para garantizar la calidad del producto final; en este ámbito es importante destacar a los análisis microbiológicos como una de las herramientas empleadas para la verificación del estado de conservación y manipulación de los productos de interés (Fuentes et al., 2013, p.67).

Por lo general, en los laboratorios, para la obtención de resultados de un ensayo cuantitativo se procede al conteo de UFC por inspección visual y de forma manual, marcando las colonias y aplicando reglas de conteos, lamentablemente la obtención de resultados a partir de estos métodos consumen grandes cantidades de tiempo, además de evidenciarse ciertos errores en el informe final, ya sea que sean ocasionados por la técnica empleada o por el personal encargado de realizar y verificar los procesos (Sánchez et al., 2017, p.78). El error más grande y significativo de un ensayo microbiológico se atribuye al momento de proporcionar los resultados.

Durante la identificación y conteo manual de colonias de microorganismos el proceso se puede dificultar, creando un problema a la hora de proporcionar resultados y validar los mismos, debido a que en muchas ocasiones no es posible disponer de valores exactos y verídicos, pues en muchas ocasiones los resultados obtenidos suelen variar de un laboratorio a otro (Fuentes et al., 2013, p.18). También existen laboratorios que disponen de muestras muy grandes que dificultan el conteo de las colonias de microorganismos, lo que deriva en la obtención de resultados erróneos, otro problema relacionado con los procesos tradicionales de conteo puede ser identificado en los casos que se desea cuantificar el número de bacterias presentes en múltiples muestras, el tiempo a emplear suele ser prolongado, por lo que en ese período las muestras podrían sufrir modificaciones en su población original (Corral et al., 2012, p.98).

Por otra parte, la determinación de sensibilidad bacteriana es indispensable para definir la terapia antibiótica para combatir al agente de una enfermedad infecciosa o para caracterizar microbiológicamente a un microorganismo. El ensayo de sensibilidad bacteriana requiere la lectura de halos de inhibición que aparecen alrededor de un disco impregnado con antibiótico. El diámetro del halo en mm, (que se mide manualmente con un vernier) varía en función de la respuesta del microorganismo frente al agente de control. Al realizar estas medidas pueden existir imprecisiones en la obtención de resultados, debidas a la observación del operador, lo cual genera un gran problema tanto para el laboratorio encargado del análisis como para el usuario del servicio de salud (Zambrano & Grass, 2008, p.15).

Por lo anterior, se evidencia la importancia de la validación de una técnica o método de medición. La validación comprende un proceso en el cual a partir de ensayos manuales o estudios de laboratorio se establece si las características, el comportamiento y propiedades de desempeño del método cumplen con los requerimientos para la aplicación y aceptación de resultados obtenidos; siendo el principal objetivo confirmar y documentar la confiabilidad de los informes entregados por el equipo analizado; así también se podrá determinar las posibles variaciones que se presentan entre un número diferente de pruebas desarrolladas, con la finalidad de disminuir las posibles fallas o errores en la implementación del método, además de la generación de altos índices de confianza en los resultados finales de cada determinación (Cuesta, 2010, p.3).

Para realizar la validación de un procedimiento microbiológico es necesario tomar en cuenta la evaluación de los medios de cultivo a emplear durante la realización del cultivo respectivo, también es necesario llevar a cabo la verificación y calibración de todos los equipos a emplear durante la prueba; además es necesario realizar una evaluación de los analistas responsables de la realización de los procesos en estudio para disminuir la presencia de errores en los ensayos posteriores (Cuesta, 2010, p.7).

JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de investigación tiene como objeto validar un software electrónico para el conteo de UFC y detectar las medidas para la determinación de sensibilidad bacteriana utilizando muestras de leche cruda, con la finalidad de obtener resultados precisos. En los laboratorios de análisis microbiológico de alimentos, el procesamiento de un elevado número de muestras con fines de control de calidad implica un mayor gasto de tiempo para el conteo de UFC, el mismo que se puede reducir al emplear una aplicación electrónica capaz de captar la imagen de un cultivo microbiano y procesarla mediante un software, permitiendo obtener un conteo automático en menor tiempo y con resultados estadísticamente confiables.

En países desarrollados ya se aplica un método alternativo de conteo automatizado que garantizan que los resultados obtenidos sean lo más exactos posibles. Una variante de estos métodos es el ejemplo del “denominado contador de colonias de Quebec el cual en sus diversas presentaciones, ya sea desde las versiones más manuales hasta las más avanzadas, básicamente cuenta con un lente de aumento, una fuente de luz, una cuadrícula y contador digital (unos botones que sirven para llevar la cuenta del número de colonias, cada vez que el usuario ve una unidad formadora pulsa un botón), que en teoría evita la necesidad de usar el marcador de tinta y de llevar la cuenta en un papel, dado que el contador digital facilita dicho proceso” (Peña et al., 2011, p.46).

Por ende, es importante ejecutar el presente trabajo que propone la validación del software para que el mismo pueda ser incorporado a la rutina de los análisis microbiológicos, liberando datos con mayor precisión, exactitud y en menor tiempo.

De este aporte se beneficiarán los diferentes laboratorios de microbiología en los que se realicen cultivos cuantitativos, como por ejemplo para el análisis microbiológico de alimentos, donde los resultados se evalúan en base a criterios microbiológicos descritos en las normas NTE INEN, a fin de evaluar la calidad microbiológica e inocuidad del producto examinado.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Validar un software electrónico para el conteo de unidades formadoras de colonias y determinación de sensibilidad bacteriana en muestras de leche cruda.

Objetivos específicos

- Realizar recuentos microbianos y determinación de sensibilidad bacteriana con muestras de leche cruda para la verificación de las funciones que realiza el software electrónico.
- Comparar el conteo manual de unidades formadoras de colonias con respecto al conteo que realiza el software electrónico mediante los resultados obtenidos en la práctica para la validación del software electrónico.
- Cuantificar el tiempo empleado para el conteo de UFC y la determinación de sensibilidad bacteriana de forma manual y utilizando el software electrónico para verificar el tiempo de reducción de estos ensayos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes

Arturo Méndez en el año 2008 a través de su tesis titulada “Sistema Automático para análisis de unidades formadoras de colonias mediante técnicas de procesamiento digital de imágenes” presenta el diseño de un sistema automatizado que facilita la identificación, clasificación, segmentación y el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) cultivadas en cajas de Petri mediante procesamiento digital de imágenes, principalmente (Mendez, 2008, p.3).

La principal ventaja de estos equipos automatizados consiste en la reducción del tiempo invertido tras la captura y el análisis de la imagen a través de una computadora personal, basándose en la morfología matemática obteniendo así resultados similares o superiores a los equipos comerciales. Es decir que el análisis estadístico demostró que el sistema novedoso posee una efectividad del 99.12% en comparación con el 99.42% del equipo comercial (Mendez, 2008, p.107).

En el año 2016 Jorge Luis Naranjo, con su trabajo de titulación denominado “Diseño e implementación de un sistema para la contabilización automática de unidades formadoras de colonias bacterianas: coliformes, mesófilos aerobios, bacilos, estafilococos y levaduras usando técnicas de visión artificial” en el cual se obtiene un resultado de 82,8 % de precisión en el conteo y con estos resultados se confirma que existe un nivel alto de confiabilidad para que el sistema sea utilizado (Naranjo, 2016, pp.12-14).

Erika Sánchez, Damaris Núñez & otros, en el año 2017 publicaron un artículo denominado “Simulación y conteo de unidades formadoras de colonias” en el cual se plantea el diseño e implementación de una aplicación móvil que mediante un sistema de visión por computadora permite realizar el conteo de colonias de bacterias en cultivos microbianos disminuyendo significativamente el tiempo de la cuantificación y generando un método estándar de conteo para dispositivos móviles con sistema operativo Android (Sánchez et al., 2017, pp.104-106).

Así como un simulador de colonias de bacterias que permite generar muestras controlando parámetros de crecimiento de bacterias con el fin de ayudar a probar la eficiencia de la aplicación de conteo de colonias de bacterias. Se obtuvo un resultado del 98% de efectividad concluyendo que la aplicación es útil en el área de Microbiología (Sánchez et al., 2017, p.109).

Por tanto, el análisis microbiólogo es indispensable para determinar la calidad de un producto, sin embargo, muchas de las veces existen errores al proporcionar los resultados, por tal razón hoy en día se han creado varios equipos y técnicas para el conteo de UFC y determinación de la sensibilidad bacteriana con la finalidad de obtener resultados certeros y en menor tiempo. Sumado

a ello existen varias aplicaciones electrónicas (apps) que se las puede descargar en el teléfono móvil y son muy útiles para realizar recuentos de UFC (UNIVERSIDAD DE LA PLATA, 2018, p.1).

1.2. Validación

El proceso de validación de permite garantizar la obtención de información analítica y confiable de un método o proceso analítico, es decir garantiza que se cumplan todos los requisitos y especificaciones previstas, permitiendo la calificación de estos procesos como aptos para su ejecución (OMS, 2014, pp.8-10).

En términos generales los procesos de validación de diversos métodos analíticos, en base a lo expuesto en la norma ISO/IEC 17027 (Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración) (Ariza, 2006, pp.9-14), permiten evaluar si la exactitud y la precisión obtenida de una serie de mediciones son apropiadas para el problema analizado, adicionalmente es importante destacar que la validación certifica la repetibilidad y comparación de resultados con otros laboratorios de análisis (OAA, 2013, pp.7-15).

1.2.1. Métodos analíticos

Los métodos analíticos son empleados para la determinación de la presencia o la concentración del o los analitos de interés, para lo cual es imprescindible que los métodos empleados estén reconocidos previo a su implementación, para lo cual es importante establecer si los procesos cumplen con los requerimientos de la normativa internacional o si presentan procesos de validación primaria o secundaria (Ariza, 2006, p.2).

Los laboratorios encargados de la realización de ensayos microbiológicos por métodos cualitativos y cuantitativos, se basan en la capacidad de crecimiento microbiológico en un medio determinado de cultivo que permite detectarlos o cuantificarlos; para el desarrollo de tipo de análisis los laboratorios deberán establecer los estándares de calidad empleados para el desarrollo de la metodología analítica que garanticen la confiabilidad y confiabilidad de los resultados a obtener (OAA, 2013, p. 6).

1.2.1.1. Clasificación de métodos analíticos

Los laboratorios encargados de la realización de métodos analíticos deben emplear métodos de ensayo que cumplan con las necesidades y requerimientos del cliente además de ser apropiados para la medición a realizar, es decir debe ser compatible con el propósito del análisis.

Métodos normalizados o de referencia:

Los métodos normalizados están estandarizados, se aplican de forma exacta a su descripción en la norma, son reconocidos internacionalmente con una aceptación amplia, se encuentran validados por otro organismo y ha sido publicado por la comunidad científica como normas nacionales o internacionales (OAA, 2013, p.11).

Métodos no normalizados:

Se trata de una modificación a un método de ensayo normalizado, por ejemplo, se hicieron modificaciones a los métodos descritos en la norma que pueden tener una repercusión sobre la calidad de los resultados, pueden considerarse aquellos métodos normalizados modificados o utilizados fuera de su alcance. Por ejemplo: otra matriz, otros medios de cultivo, diferentes tiempos/temperaturas de incubación, equipos con distintas tolerancias a las especificadas, combinación de partes del método normalizado con partes de una referencia bibliográfica, etc (OAA, 2013, p.11).

Métodos alternativos:

Son métodos de análisis que identifica el mismo tipo de analito para una categoría específica de productos, es decir todos los procesos a realizar han sido previamente comparados con el método de referencia correspondiente y acorde a un estándar aceptado. El método a emplear puede ser patentado o no comercial, se caracteriza por ser rápido y de empleo sencillo, sin embargo requiere de la validación por organismos especializados o por normas reconocidas internacionalmente (Riquelme, 2015, p.9).

Métodos microbiológicos alternativos:

Los laboratorios de análisis microbiológicos en muchas ocasiones emplean métodos de pruebas alternativos a los convencionales de las normas generales ya sea para la identificación o para la recuperación microbiana; el empleo de estos métodos se ve influenciado por factores relacionados con el rendimiento, conveniencia y valoración económica (USP, 2007, p.746).

1.2.2. Validación de un método alternativo

La validación de métodos microbiológicos alternativos permiten verificar y documentar el nivel de confiabilidad de los resultados obtenidos, además de identificar los casos posibles de variación presente entre los ensayos realizados y así favorecer a la disminución de posibles errores en método, generando un nivel elevado de confianza de los resultados emitidos por el sistema validado (Tijerina, 2015, pp.1-2).

Posee un grado de variabilidad superior a otros análisis, se destaca entre estos análisis los ensayos microbiológicos de recuento en placa de tipo convencional, presentan un rango de resultados más amplio con una desviación estándar relativa (%RSD) aproximado de 15-30 en relación a los ensayos químicos convencionales con un %RSD de 1-3 (Rodríguez, 2019, p.7).

La cuantificación tradicional de microorganismos es un procedimiento que actualmente engloba varias desventajas para el sistema de control, ya sea por errores de muestreo, placa, incubación, o errores por parte del técnico responsable, tiempo de muestreo y modificación de la muestra, situaciones que pueden generar resultados con baja exactitud o precisión (Corral-Lugo et al., 2012, p.148).

1.2.2.1. Validación de pruebas cualitativas para microorganismos

Las pruebas cualitativas para la detección de microorganismos se destacan por el uso de medios de cultivo de tipo líquido, en donde la turbidez es el principal indicativo de crecimiento microbiológico en las muestras de prueba, permitiendo evaluar la presencia o ausencia de un grupo particular de microorganismos (Rodríguez, 2019, pp.7-8).

1.2.2.2. Validación de pruebas cuantitativas para microorganismos

Las pruebas cuantitativas son empleadas para estimar el número aproximado de microorganismos viables que se encuentran presentes en la muestra analizada, entre estos métodos se destaca el recuento en placa, filtración por membrana y el método de tubos múltiples de detección del número más probable (NMP) (Rodríguez, 2019, p.8).

Los métodos cuantitativos presentan como característica principal el alto grado de variabilidad, permitiendo marcar diferencias intrínsecas entre los métodos microbiológicos y analíticos. La variación en estos métodos se centra en que la microbiología es ejercida como una ciencia logarítmica y sus métodos son capaces de diferenciar cantidades entre 100 y 1000 células (1 log) pero presenta deficiencias con cantidades inferiores, generando así errores significativos en la obtención de resultados (Rodríguez, 2019, p.8).

Las variaciones presentes en estos métodos convierten a los resultados en estimaciones en lugar de un recuento preciso del número de células presentes; la variabilidad manifestada dificulta la comparación entre métodos, es decir después de realizar dos o más mediciones empleado técnicas similares el grado de comparación llega hasta el 50% (Rodríguez, 2019). El empleo de métodos alternativos y rápidos permite obtener una comparabilidad superior, sin embargo los porcentajes de precisión se mantienen con un_%RSD en el orden de 15 a 35% (Rodríguez, 2019, p.8).

1.2.3. Parámetros de validación

La obtención de datos numéricos de las pruebas cuantitativas contribuye al empleo de técnicas estadísticas paramétricas al contrario de las valoraciones cualitativas; sin embargo pese a las diferencias la validación de estos métodos comparte ciertas determinaciones de control (Ver Tabla 1-1) (Rodríguez, 2019, p. 8).

Tabla 1-1: Parámetros de validación de pruebas cuantitativas y cualitativas

Parámetro de validación	Pruebas cualitativas	Pruebas cuantitativas
Especificidad	Sí	Sí
Exactitud	No	Sí
Intervalo operativo	No	Sí
Límite de cuantificación	No	Sí
Límite de cuantificación	No	Sí
Linealidad	No	Sí
Precisión	No	Sí
Repetibilidad	Sí	Sí

Fuente: (Rodríguez, 2019, p.8).

Realizado por: Santander, M. 2021.

1.2.4. Esquema de un procedimiento de validación de un método microbiológico

La planificación juega un rol fundamental para la correcta validación de un método, especialmente los ensayos microbiológicos que requieren la validación de técnicas de tipo automatizadas que permitan remplazar de forma parcial o completa a las técnicas manuales empleadas hasta la actualidad; para lo cual deberán cumplirse las siguientes fases (Ver Figura 1-1).

1.2.4.1. Identificación del problema analítico

El alcance de una validación siempre va a estar relacionada con la obtención de resultados confiables luego de la aplicación de un método específico de ensayo, el procedimiento debe ser realizado en base a los requerimientos del operador y de la muestra a analizar. Los objetivos del análisis deben establecerse acorde con las características del método de ensayo empleado por el Laboratorio en donde las necesidades del cliente jugará un rol fundamental para el desarrollo de la validación (OAA, 2013, p.3).

1.2.4.2. Planificación de las acciones

Las acciones a ejecutar deben ser analizadas previo a la especificación de las condiciones, los requisitos a cumplir y la definición del alcance de validación, además de definir los parámetros críticos del desempeño a obtener del método seleccionado, instaurar métodos estadísticamente aceptables para el diseño experimental y el método para el análisis de resultados.

La planificación también incluye la definición de la matriz de estudio, y de otros parámetros como temperatura, tiempo y límites de operación, descripción de la especie analizada, además del establecimiento de las limitaciones y especificaciones del método a emplear (OAA, 2013, pp.10-13).

1.2.4.3. Validación y evaluación de los resultados

La evaluación de los resultados debe ser realizado por medio de una comparación como los parámetros establecidos para el desempeño esperado del método empleado. La validez del proceso empleado se realiza acorde al objetivo y requisitos establecidos.

1.2.4.4. Informe de validación

El análisis y discusión de los resultados requieren la instauración de un plan de documentación que garantice una explicación global de todo el proceso realizado; los datos documentados deben presentar todos los parámetros de estudio con sus respectivas comparaciones con el ensayo de interés, mismos que deberán permanecer en los rangos establecidos que garanticen la obtención de información confiable (OAA, 2013, p.13).

La ejecución de un proceso de validación debe seguir el algoritmo secuencial presente en la figura 1-1.

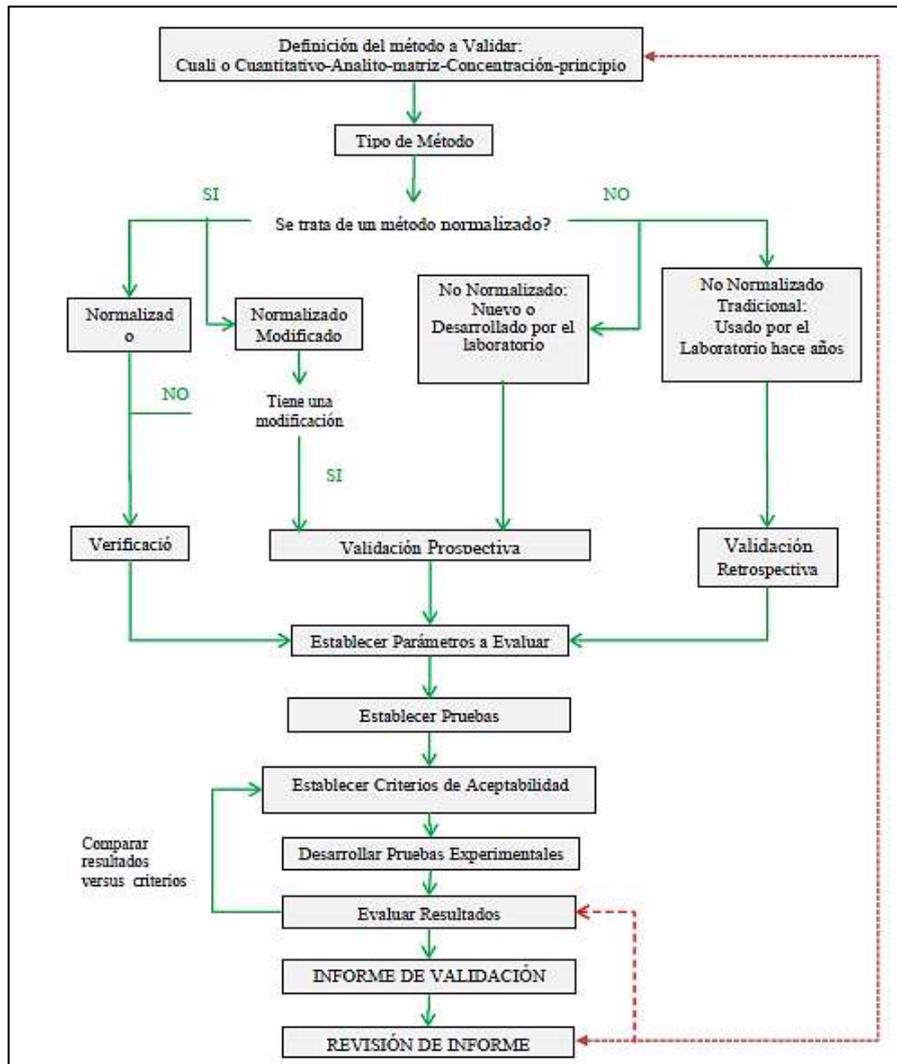


Figura 1-1: Algoritmo de validación

Fuente: (Jima, 2015, p.15).

1.3. Leche cruda

Consiste en la secreción mamaria obtenida del ordeño higiénico de vacas en buen estado de salud, sin la incorporación o eliminación de algún componente, a excepción del calostro. La misma no es sometida a ningún tipo de tratamiento con la adición de calor mayor a 40°C. Sin embargo, se encuentra destinada al consumo humano o a la fabricación de sus derivados previo algún tipo de tratamiento (INEN, 2012, p.2).

1.3.1. Generalidades

A pesar de que la leche cruda presenta un gran valor nutricional no se considera apta para el consumo humano en los siguientes casos:

- Cuando fue obtenida de animales enfermos, cansados o desnutridos
- Al ser manipuladas por personas que presenten enfermedades infectocontagiosas
- Cuando no cumpla con los requisitos organolépticos, físico químicos y microbiológicos establecidos en la noma NTE INEN para leche cruda-requisitos, siendo actualmente la quinta revisión la última realizada en el 2012
- Cuando presenta sangre o calostro en su composición
- En el caso de que el ordeño haya sido efectuado 12 días previos al parte o a su vez 7 días posteriores al mismo
- Cuando presenta metales pesados, toxinas o residuos de pesticidas en valores superiores a los permitidos
- Cuando presenta sustancias extrañas no propias del producto en cantidades superiores a las establecidas, las cuales son usadas frecuentemente para mejorar sus características. En la Tabla 2-1 se mencionan las más importantes.

Tabla 2-1: Sustancias Extrañas incorporadas en la leche cruda

FUNCIÓN	TIPO DE SUSTANCIA
Adulterantes	Suero de leche
	Almidón
	Sacarosa
	Harina
	Grasa vegetal
	Cloruros
Conservantes	H ₂ O ₂
	Formaldehido
	Dicromato de potasio
	Hipoclorito
Neutralizantes	Bicarbonato de sodio
Residuos veterinarios	Antimicrobianos
	Antihelmínticos
	Glucocorticoides
Insecticidas	Triclorfon
Colorantes	-

Fuente: (INEN, 2012, pp.2-3).

Realizado por: Santander, M. 2021.

Adicionalmente, es importante tomar en cuenta que la leche cruda debe ser filtrada y enfriada mediante agitación constante a una temperatura inferior a 10°C, posteriormente almacenada y transportada en recipientes autorizados (INEN, 2012, p.2).

1.3.2. Características organolépticas

Constituyen los primeros indicadores de calidad, sin embargo, no son del todo confiables ya que su evaluación es rápida. Entre ellos tenemos:

1.3.2.1. Color

Presenta un color blanco aporcelanado debido a las micelas de caseína y a las sales coloidales, sin embargo, se torna ligeramente amarillento gracias a la presencia de distintos componentes entre ellos riboflavina y caroteno, pero principalmente de los glóbulos de grasa que al momento de dejar la leche cruda en reposo se aprecia en la superficie una nata de color amarillo (Pardo, 2019, p.3). El color de la leche puede intensificar su blancura en el caso de que sea sometida a elevadas temperaturas, es decir a procesos de pasteurización o cambiar a café claro tras procesos de esterilización (Vásquez & Castillo, 2018, p.12).

1.3.2.2. Olor

La leche cruda presenta un olor característico, sin embargo, adquiere rápidamente el olor de los recipientes en los cuales se los almacena o el ambiente que rodea, por lo cual se encuentra estrechamente relacionado con el sabor (Abril y Pillco, 2013, p.21). Un claro ejemplo es en el caso del almacenamiento en donde puede adquirir olor de los desinfectante o detergentes (Pardo, 2019, p.3).

1.3.2.3. Sabor

Presenta un sabor ligeramente dulce, sin embargo puede variar tornándose jabonoso (por presencia de bacterias de las camas de los establos), agrio (por bacterias tras periodos largos de almacenamiento), metálico, ácido (presencia de fermentos naturales o incorporados) o podrido (presencia de *Bacillus foetidus lactis*) (Pardo, 2019, p.3).

1.3.2.4. Aspecto

La leche cruda debe ser homogénea y no presentar ningún tipo de partículas extrañas del ambiente piedras, tierra, pelos, plástico, papel o cualquiera que pueda perjudicar la salud del consumidor,

además su consistencia es líquida y viscosa debido a los azúcares y sales disueltas (Vásquez & Castillo, 2018, p.15).

1.3.3. Composición fisicoquímica

En la leche cruda el agua constituye el componente más abundante de fase líquida y en la cual se encuentra disueltos varios componentes sólidos (Pardo, 2019, p.4). La mayor parte se halla como agua libre y el resto como agua absorbida (Olortegui y Santos, 2019, p.37). El resto de los componentes físico-químicos establecidos en la norma NTE INEN. se detalla en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1: Composición fisicoquímica de la leche cruda de vaca

REQUISITO	MIN	MAX	UNIDAD
Acidez (ácido láctico)	0,13	0.17	%
Proteína	2,9	-	%
Materia grasa	3,0	-	%
Densidad relativa			
15°C	1,029	1,033	-
20°C	1,028	1,032	-
Sólidos totales	11,2	-	%
Sólidos no grasos	8,2	-	%
Cenizas	0,65	-	%
Adulterantes	Negativo	-	-
Conservantes	Negativo	-	-
Neutralizantes	Negativo	-	-
Suero de leche	Negativo	-	-
Grasa vegetal	Negativo	-	-
Prueba de brucelosis	Negativo	-	-

Fuente: (INEN, 2012, p.2).

Realizado por: Santander, M. 2021.

En cuanto se refiere a los residuos de medicamentos veterinarios el Codex Alimentarius establece los límites máximos permitidos, por lo cual es importante recalcar que su última actualización fue realizada en el 2018 y se muestran en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1: Límites de residuos de medicamentos veterinarios máximos permitidos para muestras de leche de vaca

REQUISITO	TIPO DE MEDICAMENTO	MEDICAMENTO	MIN	MAX	UNIDAD
Residuos de medicamentos veterinarios	Antihelmínticos	Albendazol	-	100	ug/L
		Doramectina	-	15	ug/ L
		Eprinomectina	-	20	ug/L
		Febantel/ Fenbendazol/ Oxfendazol	-	100	ug/ L
		Ivermectina	-	10	ug/ L
		Tiabendazol	-	100	ug/ L
		Amoxicilina	-	4	ug/ L
	Antimicrobianos	Bencilpenicilina/ bencilpenicilina procaínica	-	4	ug/ L
		Ceptiofur	-	100	ug/ L
		Clortetraciclina/ Oxitetraciclina/ Tetraciclina	-	100	ug/ L
		Colistín	-	50	ug/ L
		Dihidroestreptomicina/ Estreptomicina	-	200	ug/l
		Espectinomicina	-	200	ug/l
		Espiramicina	-	200	ug/l
		Gentamicina	-	200	ug/l
		Lincomicina	-	150	ug/l
		Monensina	-	2	ug/l
		Neomicina	-	1500	ug/l
		Pirlimicina	-	100	ug/l
		Sulfadimidina	-	25	ug/l
		Tilosina	-	100	ug/l
		Antiprotozoico	Imidocarb	-	50
	Agonista Adrenorreceptor	Clenbuterol	-	0,005	ug/l
	Glucocorticosteroide	Dexametasona	-	0,3	ug/l
	Tripanosomicida	Diminazina	-	150	ug/l
		Isometamidio	-	100	ug/l

Fuente: (FAO y OMS, 2018, pp.4-42).

Realizado por: Santander, M. 2021.

1.3.4. Calidad microbiológica

La calidad microbiológica de la leche cruda cumple un rol importante en prevención de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), ya que la leche y sus derivados pueden ser vehículos peligrosos de microorganismos, por esta razón es necesario cumplir con los protocolos

de higiene y los parámetros establecidos por las entidades sanitarias. En la Tabla 5-1 se indican los microorganismos y los límites máximos permitidos en base a la norma NTE INEN 9:2012.

Tabla 5-1: Requisitos microbiológicos de la leche cruda

Requisitos	Límite máximo	Recuento
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos	1,5 x 10 ⁶	UFC/mL
Recuento de células somáticas	7,0 x 10 ⁵	mL

Fuente: (INEN, 2012, p.3).

Realizado por: Santander, M. 2021.

1.3.4.1. Contaminantes microbiológicos

La contaminación microbiana de la leche cruda ocurre principalmente por dos razones; la primera por la ubre del animal, cuando microorganismos ambientales, por condiciones insuficientes de higiene se trasladan a la ubre y pezón, o por la presencia de mastitis; mientras que la segunda razón se atribuye directamente a los materiales y utensilios empleados para el ordeño que en muchas de las ocasiones no presentan una adecuada limpieza (Martínez et al., 2017, p. 56).

Sumado a ello, el empleo de agua no potable tanto para la limpieza de equipos y materiales como del personal puede dar lugar a la aparición de microorganismos termófilos, mesófilos y psicotrofos en cantidades superiores a los límites máximos permitidos. Por otro lado, la contaminación con microorganismos infecciosos puede dar lugar a ETA y los principales se detallan en la Tabla 7-1.

Las bacterias son normalmente destruidas por la pasteurización, pero en países como el nuestro, las bacterias patógenas constituyen un serio problema de salud pública, por las costumbres de consumir leche cruda y procesar algunos derivados lácteos a partir de leches crudas. La brucelosis, leptospirosis, listeriosis, salmonelosis y tuberculosis son algunas causas de las zoonosis bacterianas que pueden ser transmitidas por el consumo de leches crudas.

Tabla 6-1: Principales bacterias involucradas en ETA en muestras de leche

Tipo de microorganismo	Microorganismo
Gram positivo	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
Gram negativo	<i>Campylobacter spp</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Salmonella spp</i>
	<i>Yersenia enterocolítica</i>
	<i>Klebsiella sp</i>
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
	<i>Enterobacter sp</i>

Fuente: (Rodríguez y Muñoz, 2017, p.995).

Realizado por: Santander, M. 2021.

1.3.4.2. Indicadores microbiológicos

La cantidad de carga microbiana presente en la leche cruda incide directamente en la vida útil tanto de la materia prima como del producto terminado, razón por la cual en la industria láctea, para el control de calidad se emplean varios microorganismos que forman parte del grupo de indicadores, cuyos niveles permiten comprobar el cumplimiento o no de las prácticas correctas de higiene (PCH) y buenas prácticas de manufactura (BPM) (Cárdenas y Murillo, 2018, p.29).

En el presente estudio, como indicadores microbiológicos de calidad sanitaria de la leche cruda se determinó aerobios mesófilos, es decir que si su conteo es superior a los rangos establecidos por las normativas técnicas Ecuatorianas, en sus derivados y muestras procesadas indican una higiene ineficiente en algún punto crítico de producción o elaboración (Cárdenas y Murillo, 2018, p. 29).

La Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9:2012 establece los requisitos microbiológicos para la leche cruda

Tabla 7-1: Requisitos microbiológicos de la leche cruda tomada en ható

Requisito	Límite máximo	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos REP, UFC/cm ³	1,5x10 ⁶	NTE INEN 1529:-5
Recuento de células somáticas/cm ³	7,0x10 ⁵	AOAC-978.26

Fuente: (INEN, 2012).

Realizado por: Santander, M. 2021.

Microorganismos aerobios mesófilos

Constituyen todos aquellos microorganismos (bacterias, mohos y levaduras) que se desarrollan bajo la presencia de O₂ en un intervalo óptimo de temperatura de 30°C a 40°C, sin embargo, pueden crecer hasta temperaturas de 20°C y 45°C. Los resultados del conteo expresan la calidad sanitaria de la materia prima, su obtención, almacenamiento y transporte, es decir que reflejan los procesos de higiene y limpieza llevados a cabo durante un proceso (Cárdenas y Murillo, 2018, pp.29-30).

El recuento de aerobios mesófilos estima la microbiota total, aunque no se puede especificar el tipo de microorganismo presente (Campuzano et al., 2015, p. 83). Un recuento bajo de este tipo de bacterias no indica la ausencia de microorganismos pero un recuento elevado puede deberse a contaminación de la materia prima, inadecuada manipulación en los procesos de extracción o de elaboración, o inclusive tratarse de alteración del producto (Díaz et al., 2014, pp.5-6).

Una de sus principales características es la fermentación de la lactosa a temperaturas de 20°C a 45°C dando como producto la formación de ácido y gas, además, son los principales causantes de mastitis pudiendo transmitir un sin número de bacterias a la leche. En este grupo se incluyen a los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* entre otros (Cárdenas y Murillo, 2018, pp.31-32).

- *Staphylococcus aureus*: se caracteriza por ser cocos Gram positivos, agrupados en racimos, anaerobios o aerobios facultativos, inmóviles. La mayoría de las cepas producen enzimas y citotoxinas, encargadas de preparar los tejidos del huésped para absorber los nutrientes dando lugar a un aumento bacteriano y provocando intoxicaciones gastrointestinales (Cárdenas y Murillo, 2018, pp.32-33). La intoxicación por este tipo de microorganismo se debe a la actividad de una enterotoxina preformada y termorresistente, la toxiinfección se caracteriza por síntomas gastrointestinales, vómito, y diarrea que por lo general se manifiestan de 2 a 8 horas posteriores a la ingesta de la bacteria ya sea directamente o indirecta a través de alimentos como la leche. Cabe destacar que *S. aureus* es el patógeno más aislado en casos de mastitis (Campuzano et al., 2015, pp.83-84).

1.3.4.3. Fuentes de contaminación de la leche cruda

- **Ubre sana:** las glándulas mamarias debido a la exposición con el medio externo son susceptibles a contaminarse con *Lactobacillus*, *Micrococcus* y *Streptococcus*, sin embargo, no suelen ser mayores a 1000 UFC/mL. Es importante mencionar que la eliminación de los primeros chorros de leche evitará la contaminación bacteriana, por ende esta práctica debe considerarse en los protocolos correctos de ordeño para la obtención de leche (Cárdenas y Murillo, 2018, p.24).

- **Ubre con mastitis:** la mastitis consiste en la inflamación de las glándulas mamarias de la vaca modificando las características físico-químicas de la leche. Más de 100 microorganismos son los responsables de este tipo de infección, sin embargo, los más comunes con un 75% de incidencia son *Streptococcus agalactiae* o *Staphylococcus aureus* (Villanueva y Morales, 2017, p.2). Si un cuarto afectado con mastitis se mezcla con 99 sanos puede dar lugar a 1000000 UFC/mL (Cárdenas y Murillo, 2018, p.24).
- **Ambiente:** constituye el factor más importante de contaminación, la que puede darse en distintas etapas, iniciando en el ordeño, higiene de las manos del ordeñador y lugar en donde se obtendrá la leche, baldes, tubos y demás equipos necesarios. Cabe recalcar que los microorganismos no constituyen los únicos contaminantes sino también restos pesticidas que fueron empleados para el control de moscas, garrapatas y pueden tener efectos tóxicos en el ser humano (Cárdenas y Murillo, 2018, p. 24).
- **Recipientes y contenedores:** todos los equipos y recipientes empleados en la obtención y transporte de la leche pueden presentar contaminantes microbianos, además de restos de detergentes y desinfectantes proveniente de los procesos de limpieza y desinfección no efectuados correctamente. Los equipos de ordeño pueden ser fuentes de contaminación con niveles entre 1000 – 1000 UFC/mL (Cárdenas y Murillo, 2018, p.25).
- **Agua y aire:** el agua empleada en la limpieza debe ser potable, de lo contrario es fuente principal de microorganismos psicrófilos. El aire por su parte debido a la presencia de oxígeno constituye un medio contrario a la supervivencia de microorganismos, sin embargo, los Gram positivos y esporulados pueden persistir en estos elementos (Cárdenas y Murillo, 2018, p.25).
- **Suelo y estiércol:** el suelo es el principal reservorio de microorganismos termófilos, por su parte el estiércol constituye la mayor fuente de contaminación de coliformes y pueden transferirse a la leche por distintas vías ya sea por el animal, ordeñador o recipientes empleados para la extracción y transporte (Cárdenas y Murillo, 2018, p.24).

1.3.4.4. Riesgos para la salud pública

La leche y sus derivados han sido catalogados como productos alimenticios de alto riesgo en cuanto se refiere a salud pública, no únicamente por ser un alimento básico de bastante consumo sino también por la capacidad de transmitir microorganismos y dar lugar a enfermedades infecciosas; o a su vez por actuar indirectamente como transporte de restos de plaguicidas, detergentes, hormonas, medicamentos veterinarios entre los cuales se destacan los antibióticos pudiendo desencadenar en resistencia bacteriana (Máttar et al., 2009, p.580).

Las infecciones que resultan por el consumo de alimentos contaminados con microorganismos tales como *Salmonella*, *E.coli*, *Brucella*, *Mycobacterium bovis*, se presentan con síntomas tales como fiebre, diarrea, vomito, dolor o calambres abdominales, dolor de cabeza o corporal. Sin

embargo, el consumo de productos lácteos contaminados con *Listeria monocytogenes* resulta ser uno de los más perjudiciales principalmente en mujeres embarazadas ya que puede dar lugar a muertes fetales o abortos espontáneos (Cárdenas y Murillo, 2018, p.22).

1.4. Recuento bacteriano y obtención de aislados

La cuantificación de microorganismos es un proceso indispensable para el estudio de su ecología, es decir permite conocer el número y cantidad exacta de los microorganismos involucrados que tienen la capacidad de presentar un efecto benéfico o perjudicial para el hombre (Corral-Lugo et al., 2012, p.148).

El aislamiento de un microorganismo en un cultivo puro facilita el estudio de las características fisiológicas, físicas y químicas del microorganismo de interés. El proceso requiere la preparación de un medio de cultivo sólido, reparto en placa Petri, aplicar la técnica de inoculación adecuada y establecer los factores ambientales que promuevan el crecimiento bacteriano (Sánchez et al., 2017, pp.1-2). El aislamiento de microorganismos, en la práctica se logra mediante inoculación en placa de agar de diluciones seriadas o a través de siembra en estrías.

1.4.1. Métodos convencionales para la cuantificación de microorganismos

La cuantificación tradicional del número de microorganismos presentes en múltiples muestras, conlleva al empleo de procedimientos de rutina, en donde el error humano y el tiempo requerido para su ejecución, desencadenan en un porcentaje elevado de variación y por tanto la pérdida de confiabilidad de los resultados obtenidos, actualmente los métodos tradicionales han sido combinados con procesos tecnológicos que ayuden a disminuir sus desventajas en la ejecución de un análisis microbiológico (Corral et al., 2012, p.149) citado en (Sánchez et al., 2017, p.2-3).

1.4.1.1. Métodos de recuento en placa

El recuento en placa es una de las técnicas más empleadas para la determinación del número de microorganismo viables y de interés en un medio de cultivo, la cuantificación será realizada gracias a la formación de unidades formadoras de colonias (UFC) (Ramírez S, Parra V. y Alvarez Aldana, 2017, p.3).

El análisis de muestras que poseen una concentración elevada de microorganismos requiere la preparación de diluciones seriadas con un proceso previamente determinado las placas en donde esta concentración permanezca elevada pese a las diluciones realizadas, los microorganismos

presentes formarán un crecimiento masivo, en cambio si la concentración se encuentra disminuida, la cuantificación de UFC será muy baja (Basu et al., 2015, p.1).

El método de recuento en placa se clasifica en base al tipo de siembra, presentándose dos variables representativas:

Siembra en profundidad

El método de recuento en placa por siembra en profundidad es empleado para la cuantificación de microorganismos catalogados como anaerobios facultativo o microaerófilos.

- El medio de cultivo es fundido y enfriado es colocado sobre la caja Petri que posee una determinada cantidad de la dilución
- La placa es tapada a la vez que se rota para la mezcla de la dilución en el agar
- La solidificación del agar es empleada como un indicativo para el inicio de incubación de las placas
- Las colonias podrán desarrollarse dentro del agar y en la superficie (Basu et al., 2015, pp.2-5) (Ver Figura 2-1)

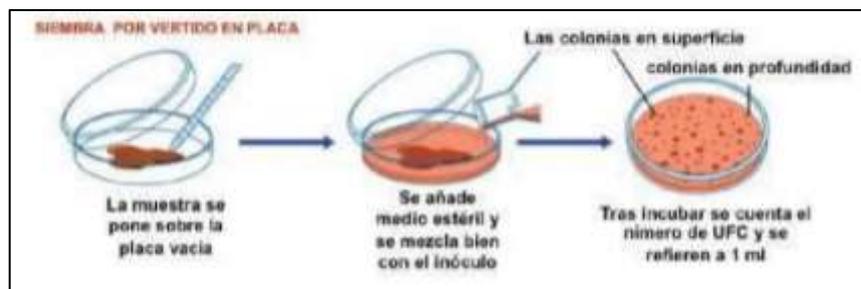


Figura 2-1: Siembra a profundidad

Fuente: (Sanz, 2018, p.41).

Siembra por extensión en superficie

El método de recuento en placa de siembra por extensión se emplea para la cuantificación de microorganismos catalogados como aerobios, adicionalmente hay otros criterios para su aplicación, como carga microbiana elevada, medio de cultivo opaco, ensayo *in situ*.

- La dilución de la muestra se siembra sobre la superficie del medio de cultivo en la caja Petri
- Las colonias se desarrollan sobre la superficie del medio de cultivo (Basu et al., 2015, pp2-5) (Ver Figura 3-1)



Figura 3-1: Métodos de siembra

Fuente: (Sanz, 2018, p.41).

1.4.2. Métodos alternativos para el recuento de UFC

1.4.2.1. Conteo automatizado de UFC

La cuantificación tradicional de microorganismos es un procedimiento que actualmente engloba varias desventajas para el sistema de control, ya sea por la alta demanda en los análisis a realizar, por estar sujeto a posibles errores por parte del técnico responsable, el tiempo a emplear o por la modificación en la población bacteriana generada hasta obtención de resultados (Corral et al., 2012, p.153).

Particular, que desencadena una disminución en los niveles de confianza de los resultados y conlleva la búsqueda de soluciones que permitan obtener resultados con el mismo nivel de efectividad pero en menor tiempo, originándose así los métodos y sistemas automatizados de conteo de UFC a partir del empleo de software y hardware compatibles (Corral et al., 2012, p.153).

1.4.3. Software electrónico para el conteo de UFC

Los sistemas automatizados y de fácil acceso emplean ciertos algoritmos de funcionamiento que facilitan la obtención de resultados, algunos sistemas, en el ambiente MATLAB tienen la capacidad de contabilizar células sin necesidad de tñirlas, en donde el único error previsible es la confusión entre los microorganismos de estudio con otras variables como el polvo o los rayones, sin embargo la combinación de estos sistemas en un futuro podrá eliminar este tipo de errores y permitirá la obtención de resultados altamente confiables (Bustamante et al., 2014, p.670).

1.4.3.1. Software para contar UFC

En la actualidad las UFC pueden ser contabilizadas a partir de imágenes de las placas mediante el uso de herramientas y técnicas de software, lo que en sí permite optimizar el tiempo empleado

en cada ensayo, además de potenciar el análisis con la obtención de otras variables de estudio como el color o tamaño de las colonias

- **Open CFU**

Open CFU es un software gratuito de código abierto que ha sido diseñado con una interfaz de usuario moderna cuya finalidad es la de facilitar su manipulación, velocidad y solidez del análisis, se caracteriza por ser más rápido, preciso y robusto que otros softwares presentes en el mercado, permitiendo la cuantificación eficiente de colonias bacterianas gracias al empleo de OpenCV para el análisis final de las imágenes del estudio (Geissmann, 2013, pp.1-8).

- **NICE**

El software NICE (Integrated Colony Enumerator) presenta una interfaz funcional que proporciona resultados precisos, con la desventaja de ser lento y carecer de filtros de postprocesamiento de las UFC detectadas; este software se encuentra escrito en MATLAB y se caracteriza por ser un procedimiento sencillo para la cuantificación de colonias a partir de imágenes procesadas con ImageJ (Geissmann, 2013, pp.1-8).

- **ImageJ y CellProfiler**

Los macros y complementos del software ImageJ se emplean para la cuantificación de colonias, estos sistemas requieren de una manipulación especial para conseguir un flujo eficiente de trabajo, siendo útil y flexible para las pruebas analizadas, este sistema además puede ser combinado con otros programas para potenciar el estudio (Geissmann 2013, pp. 1-8).

1.4.3.2. Aplicaciones para conteo de colonias en el laboratorio

Además del software de análisis tradicional, en la actualidad existen aplicaciones móviles cuya función principal es el conteo automático y semiautomático de UFC, estos programas se encuentran disponibles para dispositivos con sistemas operativos Android e iOS y pueden ser empleados gracias al uso de las cámaras integradas que fotografían las placas de agar y posterior al manejo de algoritmos internos y externos procesan los datos y pueden estimar el número de UFC (UNLP, 2018, p.1).

- **APD COLONY COUNTER**

Esta aplicación permite analizar las imágenes de placas de medio de cultivo, permitiendo la cuantificación de las UFC a través de la pantalla táctil (Ver Figura 5-1). El acceso al almacenamiento de los dispositivos Android, además el acceso directo a la cámara del dispositivo facilita la realización del análisis

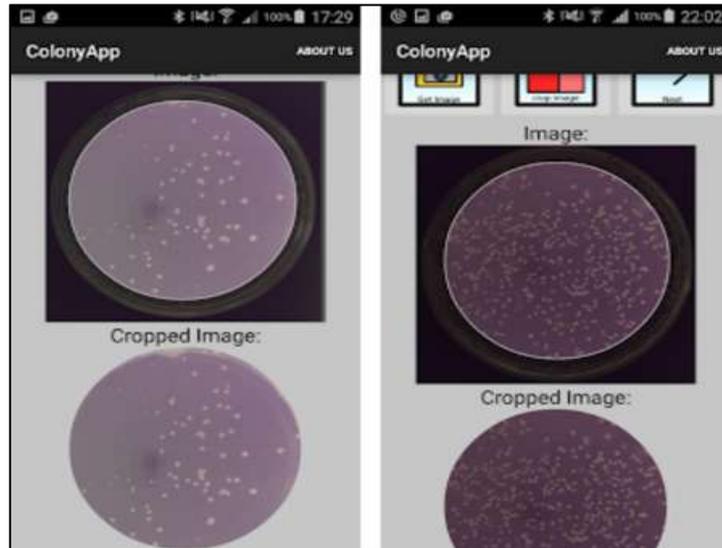


Figura 4-1: APD COLONY COUNTER plano directo de agar

Fuente: (UNLP, 2018, p. 1)

- **MEDIXGRAPH**

Es una aplicación que permite calcular con gran precisión el número de UFC en una placa de agar previamente inoculada (Ver Figura), esta aplicación permite realizar todo el proceso de cuantificación de modo automático en aproximadamente 3 segundos, siendo una herramienta útil para los laboratorios biológicos y compatible con el sistema iOS (UNLP, 2018, p.1).



Figura 5-1: MEDIXGRAPH cuantificación en placa

Fuente: (UNLP, 2018, p.1).

1.5. Sensibilidad antimicrobiana

El estudio de la sensibilidad antimicrobiana realizada a partir de antibiogramas juega un rol importante en la microbiología ya que permite evaluar la respuesta de un microorganismo a los antimicrobianos y por ende su eficacia clínica. Es decir, que mediante el antibiograma se logra evaluar la efectividad *in vitro* de los antibióticos y dar soluciones terapéuticas a procesos infecciosos (Picazo, 2000, p.4).

Previo a la ejecución de antibiograma resulta adecuado realizar un análisis cualitativo para identificar la presencia o ausencia de antibióticos. Una de las pruebas más sensibles es un test rápido Bio-X-Total antibiotic Bio K 331 de BioX Diagnostic®, puesto que es capaz de detectar varios antibióticos entre ellos: amoxicilina, ampicilina, bacitracina, cloranfenicol, dicloxacilina, eritromicina, estreptomina, oxacilina, penicilina, rifampicina, tetraciclina. Su mecanismo se basa en la inhibición de *Bacillus stearotherophilus* inoculado en agar, el resultado negativo se manifiesta tras el cambio de color de púrpura a amarillo debido al crecimiento de microorganismos mientras que un resultado positivo se evidencia cuando no existe cambio de color por la presencia de sustancias inhibitorias (Máttar et al., 2009, p.580).

Por su parte, el Test Kit MilkGuard se emplea específicamente para residuos de tetraciclinas y b-lactámicos, tras el uso de tiras reactivas se determina que es negativa cuando todas las líneas (control, T y B) se pintan de color rojo, en el caso de positiva para tetraciclinas se pintan de rojo en las líneas de control y B, por el contrario para positivo de b-lactámicos se tiñe el control y la línea T, finalmente en el caso que exista la presencia de ambos antibióticos únicamente se va a colorear la línea de control (Carrasco y Obando, 2013, p.19-23).

1.5.1. Estandarización

Para que los resultados tengan reproducibilidad y puedan ser comparables, se requiere de cepas de control de calidad de los cuales se conozcan los resultados, solo así se podrá determinar si la metodología empleada fue la adecuada. Estos parámetros incluyen:

- Conocer el tipo de bacteria a estudiar, ya que cada una de ellas presenta características propias.
- El medio de cultivo más empleado y utilizado por mostrar buena reproducibilidad y ser accesible en cuanto a costos es el Agar Müeller Hinton (MH), sin embargo, se deben controlar el pH (7.2-7.4), la humedad (35°C por 10-30 minutos previo a su uso), efecto de timidina o timina (su exceso puede afectar en la inhibición de triometoprim y sulfonamidas) y la cantidad de cationes divalentes (principalmente Mg²⁺ y Ca²⁺ ya que afectan a los resultados de aminoglucósidos y tetraciclinas)
- Temperatura de incubación: ya que altera el crecimiento bacteriano.
- Tiempo de incubación: la lectura en la mayoría debe realizarse de 18 a 20 horas, en el caso de meticilinorresistencia de *S. aureus* se requerirá una incubación de 24 horas.
- Características de los antibióticos: fecha de caducidad o potencia de los mismos (Taroco, Seija y Vignoli, 2008, pp.664-665).

1.5.2. Método de Kirby-Bauer

Consiste en un método de difusión en agar, el cual se basa en colocar los discos de antibióticos en la superficie del agar MH, previamente inoculada con el microorganismo a analizar. Al momento que el disco absorbe agua del medio el antibiótico se difunde y empiezan a formarse los halos de inhibición posterior a las 18 horas de incubación, en el caso de estafilococos o enterococos es necesario dejar has 24 horas para asegurar la sensibilidad para vancomicina y oxacilina (Picazo, 2000, pp.4-8).

La interfase entre los microorganismos inhibidos y los que se encuentran en crecimiento se le denomina concentración crítica y está próxima a la concentración mínima inhibitoria CMI, sin embargo, no es posible establecer un valor directo del mismo, para cuantificarla se deben emplear métodos de dilución. Una vez realizado el antibiograma se requiere interpretar los resultados, estableciendo si se trata de microorganismos sensibles, intermedios o resistentes, lo cual se indica en la tabla 7-1 (Picazo, 2000, pp.4-8).

Tabla 8-1: Categoría de interpretación de resistencia bacteriana

Sensibilidad	Descripción	Imagen
Resistente	Se evidencia cuando un microorganismo no se ve afectado tras haber sido sometido a altas concentraciones de antibióticos. Esta resistencia la crean como defensa siendo inmunes a los efectos de los medicamentos	
Intermedio	La respuesta a un antibiótico es totalmente variable, sin embargo, si el medicamento es colocado a las dosis adecuadas y en el lugar de la infección habrá respuesta terapéutica	
Sensible	Se refiere cuando las bacterias se ven directamente afectadas después del uso de dosis habituales de antibióticos, a consecuencia de la inactivación de los mecanismos de defensa	

Fuente: (De la Fuente et al., 2015, p.10).

Realizado por: Santander, M. 2021.

En el caso de existir colonias dentro del halo de inhibición se presume la presencia de contaminación, cultivos mixtos o colonias mutantes resistentes. Por lo general, una cepa sensible debe tener un halo de inhibición de 30-35 mm, en los casos en donde los halos sean inferiores a 15 mm son aquellos que empiezan a presentar cepas resistentes. Sin embargo, dependiendo el tipo de bacteria y el antibiótico de estudio, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) establece estándares (Ver Tabla 11-1) en base a la medición del halo de inhibición y la CIM como control de calidad de distintas muestras (Picazo, 2000, p.6).

Tabla 9-1: Estándar de diámetro de halos de inhibición y puntos de corte (CIM) para *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterobacterias*, según los datos de NCCLS

Microorganismo	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición			Punto de corte, CIM (µg/mL)	
			R	I	S	R	S
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ceftazidima	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
	Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1
	Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4
	Tetraciclina	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1
	Eritromicina	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0.5
	Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4
	Oxacilina	1	≤10	11-12	≥13	≥4	≤2
	Rifampicina	5	≤16	17-19	≥20	≥4	≤1
	Tetraciclina	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4
	Vancomicina	30	-	-	≥15	≥32	≤4
<i>Enterobacterias</i>	Ampicilina	10	≤13	14-16	≥17	≥32	≤8
	Ampicilina+Sulbactam	10/10	≤11	12-14	≥15	≥32/16	≤8/4
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1
	Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8
	Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4
	Tetraciclina	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4

Fuente: (Picazo 2000, p. 11-16).

Realizado por: Santander, M. 2021.

1.5.3. Control de calidad

Con el objetivo de que se lleve a cabo una correcta lectura del antibiograma es importante mantener un control de calidad estricto, el mismo se lleva a cabo ya que existen varias variables que puedan afectar a los resultados obtenidos, entre las más importantes se puede detallar:

- Cuidado de los discos de antibióticos: que los mismos no se encuentren vencidos o pierdan su potencia por un inadecuado almacenamiento.
- Inadecuado espesor o composición de medio
- Controlar la temperatura y el tiempo de incubación (Taroco, Seija y Vignoli, 2008, p.667).

CAPÍTULO II

2. METODOLÓGÍA

2.1. Tipo de investigación

- **Por el paradigma:**

Cuantitativa

- **Por el objetivo:**

Aplicada

- **Por el nivel de profundización en el objeto estudio:**

Comparación de grupos

- **Por la distribución del tiempo de estudio:**

Transversal-Prospectivo

- **Según la manipulación de variables:**

Experimental

- **Según el tipo de inferencia:**

Hipotética-deductiva

2.2. Diseño de la investigación

Diseño experimental: se realizó la modificación de las variables, posterior a los cultivos microbiológicos llevados a cabo, para finalmente comparar los resultados obtenidos tanto del conteo manual como del software para su validación.

Variable dependiente: número de colonias

Variable independiente: tipo de conteo

2.3. Localización del Estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Chimborazo-Riobamba.

2.4. Población de estudio

La población de estudio corresponde al software electrónico creado en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.5. Tamaño de muestra

El tamaño de la muestra corresponde únicamente al software electrónico, el cual a su vez cumple dos funciones específicas: conteo de UFC y determinación de la sensibilidad bacteriana. Cabe recalcar, que la leche cruda fue la muestra empleada para la validación del mismo, con un total de 18 muestras analizadas.

2.6. Método de muestreo

No probabilístico o por conveniencia, debido a que se seleccionó las muestras de cultivo microbiológico y antibiogramas para la validación con el software.

2.7. Selección de la muestra

Criterios de inclusión:

- Las fotografías de los Cultivos microbiológicos ingresadas en el software fueron nítidas y en base a las propiedades requeridas
- Se escogieron los cultivos microbiológicos en donde las colonias presentaban bordes regulares para obtener mejores resultados.

Criterios de exclusión:

- Se excluyó a las fotografías que no se encontraban nítidas, puesto que el software presentaba propiedades específicas para lograr su conteo.
- Se excluyó aquellos cultivos microbiológicos con colonias de bordes irregulares

2.8. Materiales, Equipos y Reactivos

Tabla 1-2: Equipos, materiales y reactivos

MATERIALES		
Material para la recolección de datos	Material de laboratorio	Material de protección
• Normas NTE-INEN leche cruda-análisis microbiológico	Cajas Petri	Guantes
	Papel aluminio	Mascarilla
	Algodón	Cofia
• Libreta de apuntes	Cinta indicadora	Mandil
	Matraz Erlenmeyer	
	Pipetas graduadas	
	Reverbero	
	Discos de antibiogramas	
EQUIPOS		REACTIVOS
Laboratorio	Adicionales	Agua peptonada al 0.1%
Incubadora	Computador	Agar Müeller Hinton
Cámara de flujo laminar	Impresora	Agar PCA
Autoclave		Agar Baird Parker
		Agua destilada

Realizado por: Santander, M. 2021.

2.9. Recolección de datos

La recolección de datos fue llevada a cabo en el año 2021 durante los meses de marzo-junio. Se inició el estudio con la recolección de muestras de leche cruda de 3 plazas de mercado: Condamine, Santa Rosa y San Alfonso. Durante este periodo de tiempo se realizaron los cultivos microbiológicos en Agar PCA para el conteo de UFC, para determinar la sensibilidad bacteriana se aisló *S. aureus*, se purificó el cultivo y a partir de una suspensión bacteriana con turbidez equivalente al estándar 0.5 Mac Farland, se inocularon por triplicado placas de Agar Müeller Hinton para colocar los discos de sensibilidad y después de la incubación de las placas a 35°C durante 24 horas, realizar la medición de los halos de inhibición de los mismos. Obtenidos los resultados se procedió a comparar con el software electrónico.

2.10. Métodos

- Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

El aislamiento se realizó por la técnica de dilución en tubos, para lo cual a partir del homogeneizado con 10 mL de leche cruda y 90 mL de agua de peptona estéril al 0.1 % se prepararon diluciones seriadas hasta 10⁻⁵. Se inoculó 100 uL de cada dilución en la superficie de Agar Baird Parker, se incubó a 35°C durante 48 horas, con una primera lectura a las 36 horas.

Se seleccionaron las colonias típicas de color negro, brillantes, convexas, con margen blanco y zona de aclaramiento, cada colonia se purificó por 3 transferencias sucesivas en Agar Müller Hinton

- Caracterización de los aislados de *S. aureus*

Tinción de Gram

A partir de colonias típicas y atípicas de *S. aureus* se preparó un frotis y se trató con cristal violeta 1 minuto, después se enjuagó con agua, se adicionó solución de Iodo-IK durante 1 minuto, se enjuagó, se trató con solución alcohol-acetona unos segundos hasta que no se aprecie color en el solvente y finalmente se adicionó fucsina de Gram durante 30 segundos, se dejó secar la preparación. Las placas se observaron con lente de inmersión y un aumento total de 1000X. *S. aureus* es un coco Gram+, se agrupa a modo de racimos de uva.

Fermentación de manitol

Los aislados purificados se caracterizaron mediante la fermentación del manitol en placas de Agar Manitol salado inoculadas mediante siembra en estría. *S. aureus* crece en el medio formando colonias de color amarillo

Ensayo de la catalasa

En un portaobjetos, con un palillo de madera se colocó material biológico procedente de una colonia

típica de *S. aureus*, se adicionó una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % y se observó la reacción positiva con desprendimiento de burbujas

- Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*

A partir de los aislamientos purificados de *S. aureus* se preparó una suspensión 0.5 MacFarland y se inocularon masivamente placas de Agar Müller-Hinton para ensayar la sensibilidad/resistencia con discos de Oxacilina 1 ug, Ampicilina 10 ug, Ceftazidime 30 ug, Eritromicina 15 ug, Tetraciclina 30 ug, Gentamicina 10 ug, Ciprofloxacina 5 ug, Cloranfenicol 30 ug, Rifampicina 5 ug, Vancomicina 30 ug. Las placas se incubaron a 35°C ±2°C durante 18 a 24 horas. Se midieron los halos de inhibición y el criterio de sensibilidad, intermedio o resistencia se determinó según las especificaciones del CLSI 2021, observadas en la Tabla 2-3.

- Protocolo propuesto para la validación del software

Se estableció ejecutar un protocolo que evalúe la linealidad, rango, especificidad, precisión como repetibilidad y reproducibilidad del software de lectura de las UFC/mL de muestra, siguiendo el trabajo realizado por (Cadena-Herrera et al., 2015).

- Linealidad y rango

Para su evaluación se procederá a tomar crecimiento microbiano, medir su densidad celular, diluir en suero fisiológico hasta la sexta dilución del orden diez, ajustar concentraciones de 2×10^6 , 4×10^6 , 6×10^6 , 8×10^6 UFC/mL en agua de peptona e inocular 100 uL de cada concentración en la superficie de PCA, incubar a 35C ±2°C. Elaborar una gráfica con las lecturas del software versus las lecturas manuales. Determinar la ecuación de la recta y R.

- Especificidad

Se determinará si el software es capaz de distinguir entre UFC y partículas extrañas o agrupamiento de colonias que ocurre mayormente en las diluciones más bajas o de alta concentración de analito (bacterias)

- Precisión

Repetibilidad

Medirá el grado de coincidencia entre los resultados de los conteos de muestras individuales, realizados el mismo día por el mismo analista, con el mismo software. Se medirá el número de UFC/mL, al menos 3 veces

Se evaluará la desviación estándar relativa de los conteos manuales y con software, el valor debe ser menor al 10% en cada caso

Reproducibilidad

Medirá el grado de coincidencia entre los resultados de los conteos de muestras individuales realizados otro día por otro analista en otro laboratorio. Se medirá el número de UFC/mL en los cultivos, al menos 3 veces.

Se evaluará la desviación estándar relativa de los conteos manuales y con software, el valor no debe ser mayor al 30%.

Se realizará la prueba F como criterio de aceptación, los resultados intralaboratorios no deben ser diferentes.

Para validar las lecturas de los halos de inhibición mediante el software se compararán estos resultados con las lecturas manuales.

2.11. Análisis de datos

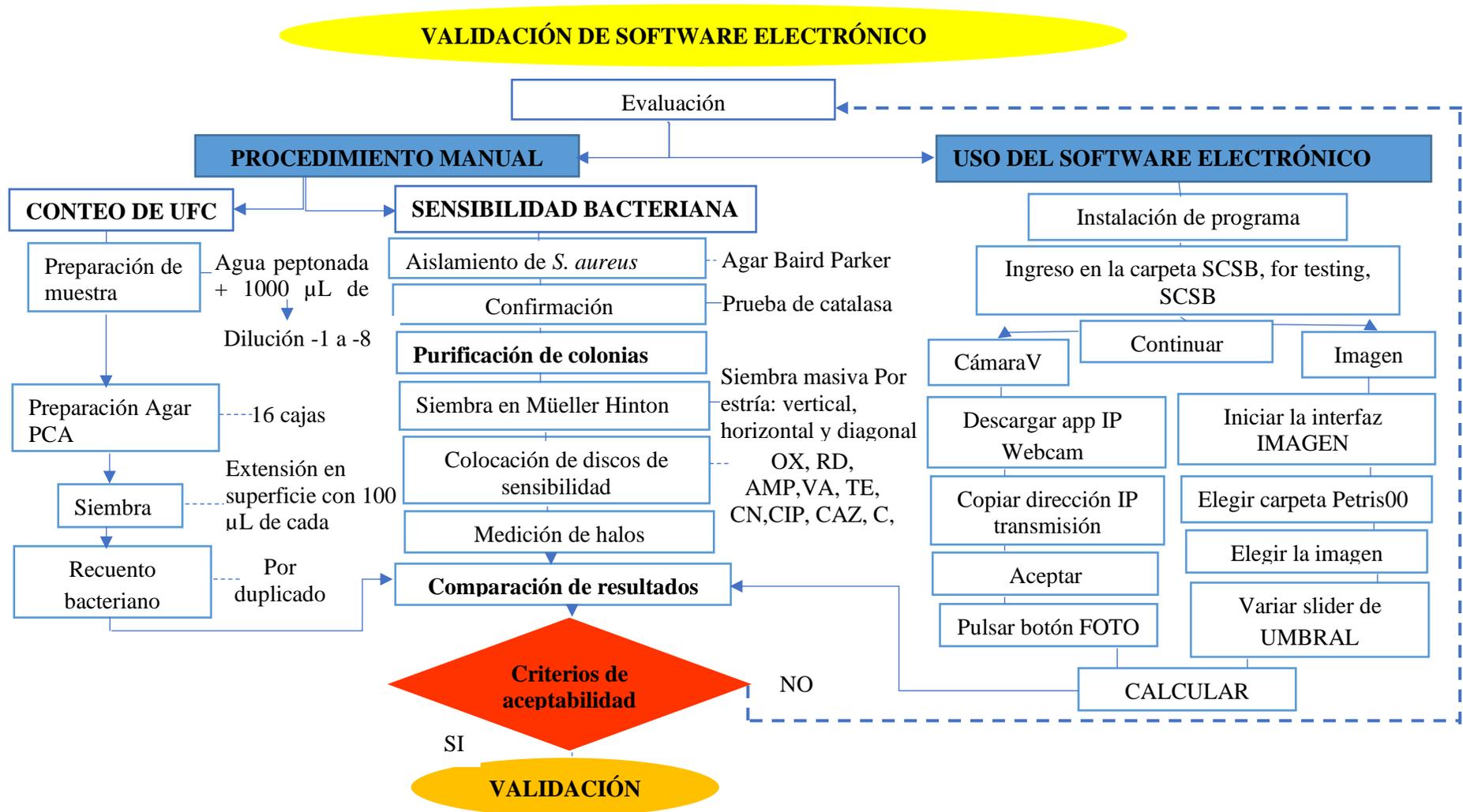


Gráfico 1-2. Proceso de Validación de Software Electrónico

Realizado por: Santander M. 2021.

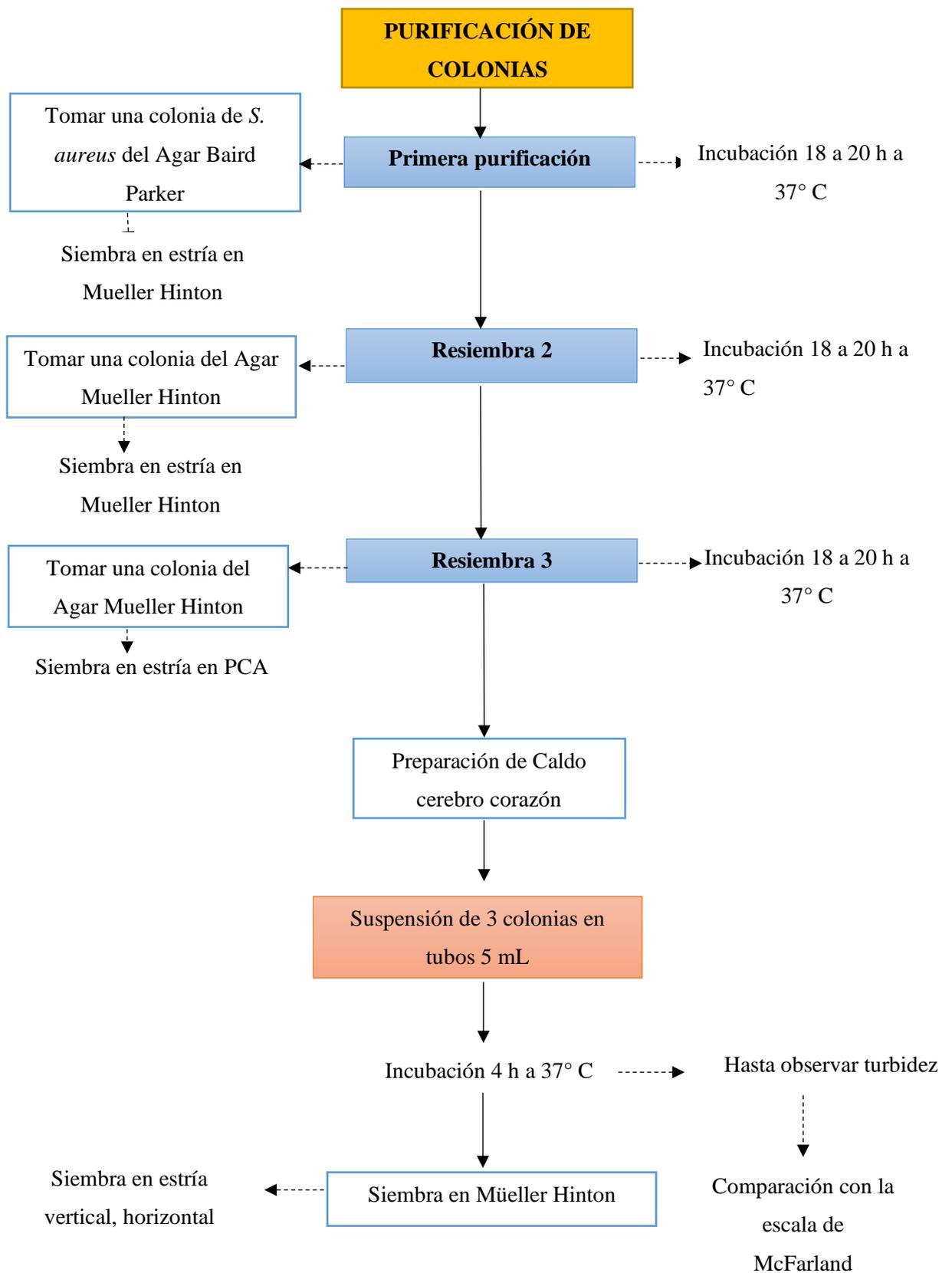


Gráfico 2-2: Proceso para la purificación de colonias

Realizado por: Santander, M. 2021.

2.12. Análisis Estadístico

La base de datos realizada se llevó a cabo en Microsoft Excel 2020. Tanto en el conteo de UFC y el antibiograma posterior a la obtención de los datos por duplicado y triplicado respectivamente, se tomó la media de los conteos y de la medición del halo de inhibición en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En base a los datos obtenidos se compara el conteo Manual con el realizado con el software, para su posterior validación.

3.1. Resultados del Conteo Manual VS el conteo mediante Software

Tabla 1-3: Resultados del conteo de UFC en muestras de leche cruda

CONTEO DE UFC MANUAL VS SOFTWARE EN MUESTRA DE LECHE CRUDA														
LUGAR DE TOMA DE MUESTRA	N° MUESTRA	CONTEO MANUAL											CONTEO SOFTWARE	
		DILUCIÓN 10 ⁻³				DILUCIÓN 10 ⁻⁴				DILUCIÓN 10 ⁻⁵				
		Serie 1	Serie 2	Media	UFC/mL	Serie 1	Serie 2	Media	UFC	Serie 1	Serie 2	Media		UFC
CONDAMINE	1	-	-	-	-	4	4	4	-	-	-	-	-	Sin lectura
	2	60	62	61	6.1*10⁵	6	5	6	-	-	-	-	-	Sin lectura
	3	58	57	58	5.8*10⁵	4	5	5	-	-	-	-	-	Sin lectura
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sin lectura
	5	88	86	87	8.7*10⁵	7	6	7	-	-	-	-	-	Sin lectura
	6	58	53	56	5.6*10⁵	4	4	4	-	-	-	-	-	Sin lectura
SAN ALFONSO	1	64	61	63	6.3*10⁵	2	2	2	-	-	-	-	-	Sin lectura
	2	-	-	-	-	4	4	4	-	-	-	-	-	Sin lectura
	3	66	65	66	6.6*10⁵	4	4	4	-	-	-	-	-	Sin lectura
	4	78	79	79	7.9*10⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	Sin lectura
	5	95	96	96	9.6*10⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	Sin lectura
	6	68	64	66	6.6*10⁵	5	6	6	-	-	-	-	-	Sin lectura

SANTA ROSA	1	93	95	94	9.4*10⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	Sin lectura
	2	58	59	59	5.9*10⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	Sin lectura
	3	-	-	-	-	38	40	39	3.9*10⁶	-	-	-	-	Sin lectura
	4	-	-	-	-	67	70	69	6.9*10⁶	-	-	-	-	Sin lectura
	5	75	79	77	7.7*10⁵	4	4	4	4*10⁵					Sin lectura
	6	-	-	-	-	35	33	34	3.4*10⁶	-	-	-	-	Sin lectura

Realizado por: Santander, M. 2021.

La industria alimentaria en base a la necesidad de mantener la calidad de sus productos debe cumplir los requisitos de la normativa nacional en cuanto a parámetros tanto fisicoquímicos como microbiológicos, el tiempo en que se tarda la ejecución de los ensayos microbiológicos tradicionales comprende entre 24 a 48 horas, y la lectura de los cultivos, cuando el número es elevado conlleva un gasto de tiempo extra que se podría reducir con el empleo de un software informático, por esta razón ha sido necesario la creación de un software para el conteo de unidades formadoras de colonias en placas de Agar, así como para la medición de los halos de inhibición en el ensayo de sensibilidad antimicrobiana.

Sin embargo, resulta importante validar el software en base a la linealidad, especificidad, precisión, mediante medidas de repetibilidad, y reproducibilidad siendo este el propósito del presente trabajo de titulación.

Dado que el presente trabajo, se encaminó en primera instancia a comparar los resultados obtenidos con el conteo manual de UFC/mL de la matriz examinada versus el conteo con el software, y que la matriz corresponde a la leche cruda que se expende en plazas de mercado de la ciudad de Riobamba, es necesario, paralelamente discutir los resultados microbiológicos.

Calidad microbiológica de la leche cruda

En la *tabla 1-3* se aprecian los resultados del conteo de aerobios mesófilos realizados a muestras de leche cruda comercializadas en las plazas de mercado la Condamine, San Alfonso y Santa Rosa, todas las determinaciones se realizaron por duplicado. La norma NTE INEN 1529: 5 para leche cruda establece que el límite máximo de aerobios mesófilos es de $1.5 \cdot 10^6$ UFC/mL (INEN 2012, p. 3). Tomando este criterio, el 72% (13/18) de las muestras obtenidas presentaron el nivel de aerobios mesófilos dentro del límite establecido para la leche cruda y el 28% (5/18) muestras superan dicho límite, desafortunadamente en este primer estudio el software no dio lectura a ninguna de las imágenes ingresadas, por lo tanto, no fue posible la comparación de lecturas.

Conteo de aerobios mesófilos

El alto valor nutritivo de la leche de vaca determina que sea uno de los alimentos naturales más completos; sin embargo su composición bioquímica compleja asociada a una alta actividad de agua, superior a 0.990, un valor de pH cercano a la neutralidad, 6.5- 6.7 son factores que propician las condiciones óptimas para el metabolismo y el crecimiento microbiano (Quigley et al., 2013), es así como la leche cruda contiene bacterias benéficas que contribuyen a la salud humana pero también, puede transmitir microorganismos peligrosos responsables de la descomposición y de varias enfermedades, razón por la cual la leche debe producirse mediante prácticas adecuadas de

higiene en sus fases de pre ordeño, ordeño y post-ordeño, a fin de que cumpla su propósito en lugar de constituir un riesgo para la salud pública.

Las prácticas adecuadas de higiene deben dirigirse al personal, al manejo de animales, de equipos e instalaciones (a nivel de industria), con el propósito de reducir el riesgo de contaminación con potenciales patógenos, lo cual se relaciona también con la ausencia de mastitis y garantiza una leche adecuada para consumo humano (Ishag, 2015).

Es importante mencionar que el no mantener buenas condiciones de higiene de las ubres de la vaca previo a la obtención de la leche o la presencia de mastitis conllevan a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) dando lugar a un conteo de UFC superior a los límites permitidos (Martínez-Vasallo et al., 2017).

Las condiciones higiénicas en las que se produce la leche se miden generalmente a través de un recuento de microorganismos aerobios mesófilos y células somáticas (INEN 1529:5) En este caso, con base en el objetivo del presente estudio se realizó solo el primer ensayo, encontrándose valores que oscilan entre 4×10^5 a 6.9×10^6 así como niveles superiores a 3×10^6 de UFC/mL en las muestras examinadas.

Los conteos de aerobios mesófilos que superen al valor límite indican contaminación microbiana y pueden afectar a las características sensoriales llevando al rechazo por parte del consumidor. Esto ocurre cuando no se cumplen los requisitos de higiene surgiendo un peligro grave para la salud de los consumidores, porque la leche cruda contaminada puede ser fuente de patógenos y de algunas enfermedades (Pyz-Lukasik et al., 2015).

La contaminación microbiológica de la leche cruda ocurre principalmente a nivel de la explotación lechera y las bacterias pueden provenir de diversas fuentes, tales como el interior de la ubre, el equipo de ordeño y en el almacenamiento. Actualmente, se sabe que la leche no es estéril dentro de la ubre de vacas saludables a diferencia de lo que se creía anteriormente, allí se han detectado un amplio rango de microorganismos que incluyen *Ruminococcus*, *Bifidobacterium* y *Peptostreptococcaceae*, que deben entrar por la ruta entero-mamaria (Young et al., 2015). Otras fuentes adicionales de contaminación son la superficie de la ubre, el equipo de ordeño, el ordeño manual (Elmoslemany et al., 2010). Cuando las ubres están afectadas de mastitis, en la leche pueden encontrarse *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Escherichia*. Como se aprecia, en la leche existe un microbiota diverso, el estudio realizado por Elmoslemany et al., demostró que la microbiota de la leche cruda puede variar dentro de una misma granja y entre otras granjas debido a que en este último caso se trata de ambientes diferentes (Elmoslemany, A.M. et.al., 2010).

Considerando que el indicador más común de la calidad microbiológica de un producto es el recuento de microorganismos aerobios mesófilos, se eligió a este parámetro para evaluar la calidad de la leche cruda encontrándose algunas muestras con una calidad microbiológica mala, al superar el límite permitido de unidades formadoras de colonias/mL, lo que implica la no

aceptabilidad de dicho producto para el consumo humano, pues dichos conteos revelan un nivel de aerobios mesófilos superior 3×10^6 UFC/mL.

Esta condición puede explicarse fácilmente por falta de refrigeración de la leche, de acuerdo a (Muehlhoff E., et.al. 2013) cualquier método que no implique el enfriamiento rápido de la leche en las dos primeras horas después del ordeño ocasiona, en mayor o menor medida, algún grado de deterioro de su calidad (Muehlhoff, E. et. al., 2013).

Los conteos de aerobios mesófilos en las muestras examinadas presentaron niveles mucho más altos a lo reportado por (Peralta-Torres et al., 2021) para un análisis similar realizado en México, resaltando que los criterios normativos de este país fijan como límite permitido valores \leq a 100.000 UFC/mL (Peralta-Torres et al., 2021).

Para un conteo elevado que sobrepase los límites establecidos, pueden contribuir: la falta de prácticas higiénicas durante el ordeño, dados por insuficiente higiene y desinfección de la ordeñadora mecánica o su mal funcionamiento, inadecuado manejo de desinfectantes y selladores para los pezones, medidas de control inefectivas o ausentes, al igual que los tratamientos (Bonifaz, García y Requelme, 2011). Adicionalmente influirán la infraestructura del sitio del ordeño, el recipiente recolector de leche, la higiene de las manos y la indumentaria del ordeñador, las condiciones de transporte hasta el mercado de expendio en relación a temperatura, la higiene de los recipientes, higiene del local y del expendedor. Es decir, para el nivel final de aerobios mesófilos en la leche cruda intervienen múltiples factores pero posibles de controlar cuando se dispone de procedimientos claros, el personal está capacitado y se ha elaborado un plan de mejoras que permita un seguimiento estricto del proceso (Bonifaz, García y Requelme, 2011).

Por otra parte, el 72% de las muestras examinadas (13/18), mostraron conteos entre 4×10^5 y 6.9×10^6 UFC/ mL, por lo tanto, cumplen el requisito microbiológico para la leche cruda establecido en la Normativa Ecuatoriana INEN 9: 2012. Y aparentemente resultan aceptables para el consumo, sin embargo, este nivel puede deberse a la adición de inhibidores bacterianos, derivados de cloro, formaldehidos, oxidantes, antibióticos cuyo análisis no se realizó.

¿Pero, en nuestro país, cuál es la disposición sobre la venta de leche cruda? En el Acuerdo Ministerial 2013-001, artículo 38 se prohíbe la comercialización directa de leche cruda o leche cruda enfriada y otros lácteos elaborados para consumo humano, sin embargo, se exceptúan los productos que requieren leche cruda para su elaboración, pero en este caso se deberán tomar medidas para garantizar la inocuidad del producto final. Por consiguiente, la venta de leche cruda en los mercados públicos de la ciudad de Riobamba y del país, es una actividad que no está autorizada por representar un riesgo para la salud pública, los resultados de este sondeo así lo evidencian.

Al respecto cabe señalar que la regulación y control de la cadena de producción de lácteos está normada en el país por el mencionado acuerdo Ministerial que busca “asegurar la calidad e inocuidad en los procesos de producción, manipulación, elaboración y comercialización de la

leche y sus derivados a fin de garantizar la salud de los consumidores y el acceso al mercado”. Esta normativa la ejecuta la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (Agrocalidad), (ARCSA, 2021).

Justamente el riesgo para la salud pública se atribuye a la potencial presencia de patógenos como *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Escherichia coli* enteroagregativa, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. La leche también puede ser contaminada por *Mycobacterium bovis* que ha surgido como microorganismo reemergente en varios países, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* y *Cronobacter* spp (Brooks J, Koousta M, 2012), se conoce que estas poblaciones dependen del tamaño de la granja, número de animales, higiene, manejo, localización geográfica y piso climático (Ministerio de Salud y Protección social, 2011).

Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana

Los centros destinados al control y prevención de enfermedades, junto a la FDA definen que la leche junto a sus derivados engloba al sector de mayor riesgo biológico para la salud pública; debido a la susceptibilidad de transmisión de enfermedades ocasionadas por presencia de microorganismos y otros contaminantes tales como plaguicidas, hormonas y medicamentos de uso veterinario como los antibióticos, cuyo empleo se deriva del régimen terapéutico de enfermedades infecciosas. Es importante destacar que, las cepas resistentes se explicarían por el uso desmedido de antimicrobianos debido a profilaxis (vacas no lactantes), tratamiento (mastitis, neumonía, podofilitis) o promoción del crecimiento, lamentablemente pese a sus beneficios a nivel veterinario, la presencia de antibióticos o antimicrobianos en la leche puede generar efectos adversos en el consumidor tales como disbacteriosis, alergias, daño en la microbiota gastrointestinal, efectos tóxicos y sobre todo resistencia a los antibióticos a los que se ve expuesto. (Máttar et al., 2009).

Se seleccionó a *S. aureus* para el ensayo de sensibilidad antimicrobiana, debido a que esta bacteria es un comensal habitual de la piel y membranas mucosas de humanos y animales, cuyas cepas patogénicas han resultado implicadas en infecciones de sus hospederos, incluyendo la toxiinfección alimentaria muy frecuente a nivel global (Haag, Ross, Fitzgerald y Penadés, 2019). La leche cruda contaminada con estafilococos puede vehiculizar enterotoxinas y cepas resistentes a los antibióticos (Argudín, Mendoza y Rodicio, 2010), a través de elementos genéticos móviles tales como plásmidos y profagos, las islas de patogenicidad pueden transferir horizontalmente estos determinantes entre cepas, propiciando la evolución del patógeno (Mashouf et al., 2015) y cambios continuos en su perfil de resistencia.

Otro criterio de selección fue la ubicuidad y presencia de estafilococos en la leche cruda a partir de varias fuentes de contaminación, personal de la granja, ambiente: aire, utensilios

contaminados, suelo, agua, pero sobre todo la piel humana o de los animales (Ho, Boost y Donoghue, 2020).

En la Tabla 2-3, se identifican los resultados obtenidos del antibiograma, mediante el análisis manual de los halos de inhibición se obtuvo para *S. aureus* resistencias intermedias a Ceftazidima (Cefalosporina de tercera generación) y Vancomicina (Glucopéptido); con 100% y 17% respectivamente. En contraste, se detectaron aislados sensibles a Oxacilina, Ampicilina (Penicilina), Rifampicina (Rifampicina), Tetraciclina (Tetraciclinas), Gentamicina (Aminoglucósido), Ciprofloxacino (Fluoroquinolonas), Cloranfenicol (Anfenicoles), Eritromicina (Macrólidos).

Tabla 2-3: Resultados del antibiograma manual y software en muestra de leche cruda para *S. aureus*

RESULTADOS ANTIBIOGRAMA – SENSIBILIDAD BACTERIANA												
Cepas	Antibiótico	Valor de referencia			Manual				Software			
		S	I	R	1 (mm)	2 (mm)	3 (mm)	Media (mm)	S	I	R	
Cepa 1	OX	≥13	11- 12	≤10	19	17	18	18	X			sin lectura
	RD	≥20	17- 19	≤16	31	24	32	28,8	X			sin lectura
	AMP				37	36	38	37	X			sin lectura
	VA	≥15			16	15	14	15	X			sin lectura
	TE	≥19	15- 18	≤14	27	27	26	26,7	X			sin lectura
	CN	≥15	13- 14	≤12	23,5	24	22,5	23,3	X			sin lectura
	CIP	≥21	16- 20	≤15	32	31	32	31,7	X			sin lectura
	CAZ				20	20	21	20,3			X	sin lectura
	C	≥18	13- 17	≤12	32	28	20	26,2	X			sin lectura
	E	≥23	14- 22	≤13	30	27	28	28,3	X			sin lectura
Cepa 2	OX	≥13	11- 12	≤10	21	16	21	19,2	X			sin lectura
	RD	≥20	17- 19	≤16	31	32	32	31,7	X			sin lectura

Cepa 3	AMP			37	33	35	35	X	sin lectura		
	VA	≥15		16	16	16	16	X	sin lectura		
	TE	≥19	15-18	≤14	29	28	28	28,3	X	sin lectura	
	CN	≥15	13-14	≤12	23,5	23,5	22	22,7	X	sin lectura	
	CIP	≥21	16-20	≤15	29,5	30	28	29,2	X	sin lectura	
	CAZ				21	19,5	16	18,7		X	sin lectura
	C	≥18	13-17	≤12	25	22	25	24	X	sin lectura	
	E	≥23	14-22	≤13	25,5	25,5	24	25	X	sin lectura	
	OX	≥13	11-12	≤10	24	22	22	22,6	X	sin lectura	
	RD	≥20	17-19	≤16	32	31	31	31,3	X	sin lectura	
	AMP				34	34	31	33	X	sin lectura	
	VA	≥15			16	15	15	15,3	X	sin lectura	
	TE	≥19	15-18	≤14	28	27	27	27,3	X	sin lectura	
	CN	≥15	13-14	≤12	22	22	22	22	X	sin lectura	
CIP	≥21	16-20	≤15	31	30	30	30,3	X	sin lectura		
CAZ				20	19	19,5	19,5		X	sin lectura	
C	≥18	13-17	≤12	28	29	28	28,3	X	sin lectura		
E	≥23	14-22	≤13	26	23,5	22	23,8	X	sin lectura		
Cepa4	OX	≥13	11-12	≤10	20	20	22	20,6	X	sin lectura	
	RD	≥20	17-19	≤16	33	31	33	32,3	X	sin lectura	
	AMP				27	31	36	31,1	X	sin lectura	
	VA	≥15			17	16	16	16,3	X	sin lectura	

Cepa 5	TE	≥19	15-18	≤14	28	27	27	27,3	X	sin lectura
	CN	≥15	13-14	≤12	24	22	22,5	22,8	X	sin lectura
	CIP	≥21	16-20	≤15	31	31	32	31,3	X	sin lectura
	CAZ				21	19	20,5	20,1	X	sin lectura
	C	≥18	13-17	≤12	28	19	28	24,6	X	sin lectura
	E	≥23	14-22	≤13	26	25	26	25,7	X	sin lectura
	OX	≥13	11-12	≤10	20	16	22	19,2	X	sin lectura
	RD	≥20	17-19	≤16	30	30	31	30,3	X	sin lectura
	AMP				34	33	34	33,7	X	sin lectura
	VA	≥15			17	16	17	16,7	X	sin lectura
Cepa 6	TE	≥19	15-18	≤14	27	27	27	27	X	sin lectura
	CN	≥15	13-14	≤12	21,5	20	20,5	21	X	sin lectura
	CIP	≥21	16-20	≤15	27	26	27	26,7	X	sin lectura
	CAZ				18,5	18,5	17,5	18,2	X	sin lectura
	C	≥18	13-17	≤12	24	20	25	22,9	X	sin lectura
	E	≥23	14-22	≤13	25	24	26	25	X	sin lectura
	OX	≥13	11-12	≤10	21	19	20	20	X	sin lectura
	RD	≥20	17-19	≤16	29	29	30	29,3	X	sin lectura
	AMP				34	34	34	34	X	sin lectura
	VA	≥15			15	12	16	14,2	X	sin lectura
TE	≥19	15-18	≤14	25	24	24	24,3	X	sin lectura	
CN	≥15	13-14	≤12	21	18,5	20,5	20	X	sin lectura	

CIP	≥21	16-20	≤15	24	28	26,5	26,1	X	sin lectura
CAZ				16	18	16	16,6	X	sin lectura
C	≥18	13-17	≤12	24	25	25	24,7	X	sin lectura
E	≥23	14-22	≤13	19	28	25	23,7	X	sin lectura

Realizado por: Santander, M. 2021.

El método de Kirby-Bauer o difusión en disco, fue empleado para el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana, siendo indispensable la caracterización y purificación de colonias de *S. aureus*, previo al desarrollo del procedimiento que siguió las directrices de la Clinical and Laboratory Standart Instituye (Clsi, 2013, p.42).

Este ensayo implica el cumplimiento de condiciones estándar como el uso de medio de cultivo: agar Müller Hinton, inóculo: una suspensión equivalente al estándar 0.5 MacFarland, incubación a 35°C, en aerobiosis, lecturas del ensayo a las 18-241 horas, uso de 6 discos por placa de 100 mm, cepa control, *S. aureus* ATCC 25923.

El CLSI 2021 establece valores de referencia específicos de los halos de inhibición de ciertos antibióticos para determinadas cepas, sin embargo, Ampicilina y Ceftazidima que están marcadas de color celeste en Tabla 2-3 no presentaban valores estándar de la zona de inhibición para el microorganismo en estudio, por lo cual, se siguió el criterio de la NCCLS que indica que un estándar general para cepas resistentes presentan un halo menor a 15, por el contrario si resulta ser mayor a 30 son cepas sensibles. Similar a la Tabla 1-3 las mediciones en el software no arrojaron ningún resultado por ende la comparación manual con el software en este primer estudio no pudo llevarse a cabo.

En la Tabla 3-3 se aprecia el perfil de sensibilidad antimicrobiana de *S. aureus*, de acuerdo con el ensayo actual

Tabla 3-3: Porcentaje de sensibilidad y resistencia bacteriana de *S. aureus*

Nº Cepa	DISCOS (ANTIBIÓTICOS)									
	Oxacilina 1ug (OX)	Rifampicina 5ug (RD)	Ampicilina 10ug (AMP)	Vancomicina 30ug (VA)	Tetraciclina 30ug (TE)	Gentamicina 10ug (CN)	Ciprofloxacino 5ug (CIP)	Ceftazidima 30ug (CAZ)	Cloranfenicol 30ug (C)	Eritromicina 15ug(E)
Cepa 1	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
Cepa 2	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
Cepa 3	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
Cepa 4	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
Cepa 5	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
Cepa 6	S	S	S	I	S	S	S	I	S	S
% Sensibilidad/ Antibiótico	100%	100%	100%	83%	100%	100%	100%	0%	100%	100%
% R. Intermedio/ Antibiótico	0%	0%	0%	17%	0%	0%	0%	100%	0%	0%
% Resistencia/ Antibiótico	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Realizado por: Santander, M. 2021.

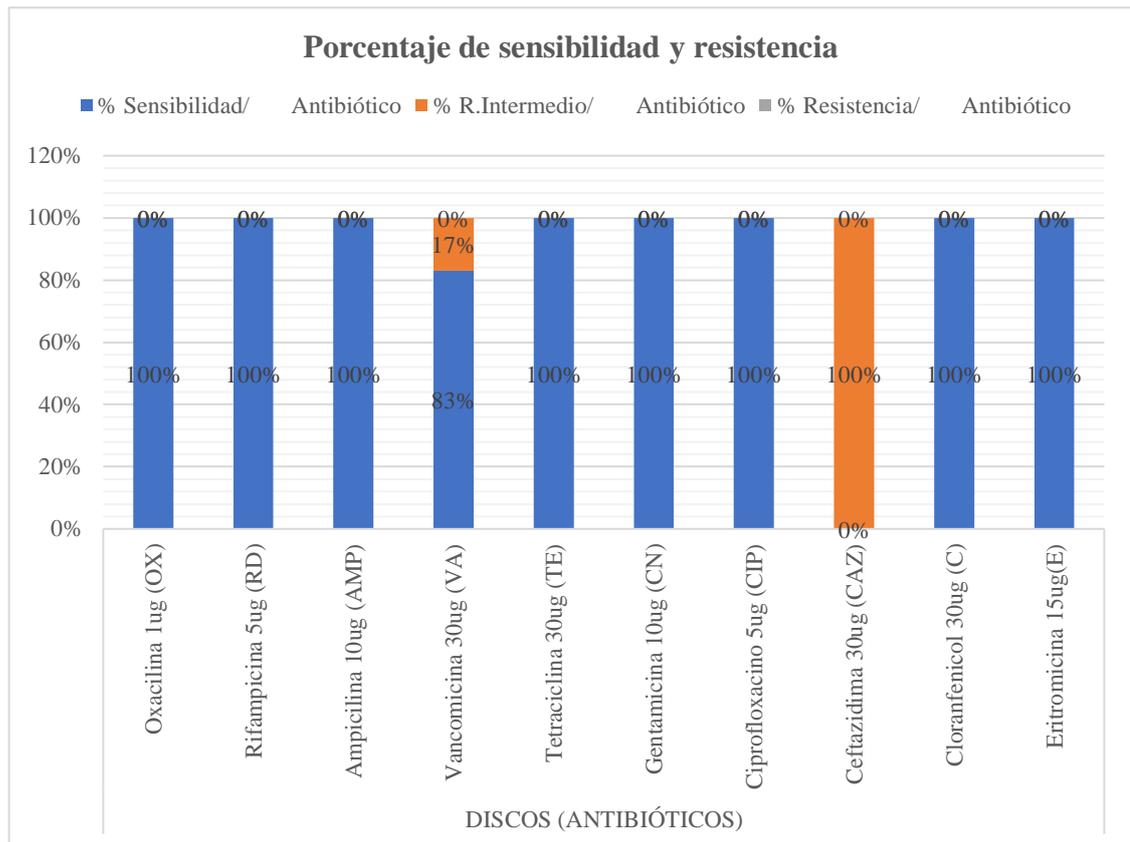


Gráfico 1-3: Porcentajes de sensibilidad y resistencia bacteriana

Realizado por: Santander, M. 2021.

El perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *S. aureus*, refleja la sensibilidad a la Oxacilina indicando que no existen aislados meticilino resistentes, en las leches examinadas, donde es muy probable que los aislados resistentes hayan llegado durante el ordeño (Agbortabot Bissong et al., 2020). Mientras tanto, en el caso de la resistencia a la Vancomicina, el problema adjunto es la posible diseminación a bacterias patogénicas o comensales de la microbiota intestinal (Muhairi et al., 2019).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación, se determinaron microorganismos aerobios mesófilos y la sensibilidad antimicrobiana de *S. aureus* aislado de leche cruda comercializadas en mercados públicos de la ciudad de Riobamba, con el fin de disponer de cultivos para la aplicación de un software electrónico que reduzca el tiempo empleado en la lectura manual de los resultados.

Los resultados del recuento de aerobios mesófilos en 18 muestras de leche de tres mercados La Condamine, San Alfonso y Santa Rosa corresponden en un 28% (5/18 muestras) a mala calidad microbiológica al sobrepasar el límite establecido en el país 1.5×10^6 , en una magnitud estimada en más del doble de UFC/mL; sugiriendo contaminación ocurrida antes, durante y después del ordeño por causas multifactoriales. Estas muestras son inaceptables para el consumo y revelan la necesidad de capacitación en buenas prácticas de producción e higiene en las explotaciones lecheras y vigilancia sanitaria para el expendio del producto.

En el caso de muestras con niveles entre 4×10^5 y 6.9×10^6 UFC/mL, estas cumplen el límite microbiológico, pero no se tiene seguridad sobre la ausencia de inhibidores microbianos, por otra parte, los resultados obtenidos corresponden a muestras puntuales adquiridas en tiempos y espacios definidos siendo los resultados sensibles a variación.

Respecto a la susceptibilidad antimicrobiana de *S. aureus* el ensayo reveló sensibilidad, a los antibióticos con actividad frente a *S. aureus*, sin constituir un problema para la salud pública con relación a la transferencia horizontal de genes de resistencia, lo que si se atribuye a los estafilococos con criterio intermedio frente a la vancomicina y resistentes a la ceftazidima.

El software demostró incapacidad para arrojar lecturas de los cultivos *in vitro* (reales) que permitan una comparación con las lecturas manuales, así como el desarrollo de ensayos microbiológicos específicos con fines de validación, a través de criterios de linealidad, especificidad, repetibilidad y reproducibilidad, aunque se incursionó en el presente estudio teniendo como base ensayos preliminares promisorios del funcionamiento del software para el uso previsto.

RECOMENDACIONES

Utilizar todas las medidas d bioseguridad dentro del laboratorio para evitar algún tipo de accidente.

Elegir las placas con una cantidad adecuada de UFC para poder realizar en conteo manual.

Al momento de realizar los antibiogramas, no utilizar muchos discos de sensibilidad en una misma placa ya que puede existir confusiones en el momento de realizar la medición del halo sensibilidad

Verificar con anterioridad exhaustivamente la funcionalidad del software, para evitar inconvenientes de último momento.

GLOSARIO

Exactitud: La exactitud es el indicativo de la proximidad o concordancia existente entre el valor verdadero y los datos obtenidos; en microbiología la exactitud es expresada como el porcentaje obtenido de la recuperación de los microorganismos a través del método de valoración (Rodríguez, 2019, p.8).

Precisión: La precisión es un indicativo de la reproducibilidad o concordancia de los resultados obtenidos a partir del mismo proceso y muestra; la precisión es expresada como la desviación estándar (s) de un proceso; en los análisis microbiológicos es definida como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación aplicado para medir el nivel de coincidencia entre los datos obtenidos de pruebas individuales después de aplicar muestreos múltiples (Rodríguez, 2019, p.34-35).

Especificidad: La especificidad es definida como el grado en el que se puede encontrar afectado un método analítico, por los otros componentes presentes en la matriz de la muestra; es decir se encarga de la medición exacta y específica de la concentración de analito con y sin las interferencias producidas por las impurezas, excipientes o productos de degradación presentes en la muestra, y es expresada como el nivel de inexactitud del método empleado (MINSa, 2005, p.12-13).

Límite de detección: El límite de detección es definido como la detección mínima de un analito que puede ser detectada en una única medición muestral, con un grado de confianza definido, pero no con una cuantificación exacta (Rodríguez, 2019, p.23). El límite de cuantificación corresponde al número más pequeño de microorganismos presentes en una muestra que pueden ser identificados al ejecutar las condiciones experimentales previamente establecidas y puede ser expresado como la concentración presente del analito (MINSa, 2005, p.8).

Límite de cuantificación: El límite de cuantificación es definido como la concentración mínima del analito de una muestra que puede ser cuantificada con un grado aceptable de exactitud y precisión, posterior al empleo de un método analítico específico. Este parámetro es empleado para la cuantificación de productos de desecho e impurezas (MINSa, 2005, p.1). En microbiología el límite de cuantificación es igual a la concentración más baja de microorganismos que pueden ser contabilizados con exactitud

Linealidad: La linealidad es la habilidad del método analítico para conseguir datos directa o indirectamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en una categoría definida. Su determinación se obtiene a partir del tratamiento matemático de los datos obtenidos durante el análisis del analito a diferentes concentraciones (MINSa, 2005, p.1).

Repetibilidad: La repetibilidad es equivalente a la precisión en los resultados obtenidos de ensayos independientes ejecutados a través de las mismas condiciones de aplicación (MINSa, 2005, p.2).

BIBLIOGRAFÍA

ABRIL, A. y PILLCO, V., 2013. *Calidad Fisicoquímica de la leche cruda que ingresa a la ciudad de Cuenca, para su comercialización*. S.l.: Universidad de Cuenca (Ecuador).

AGBORTABOT BISSONG, M.E., TAHNTENG, B.F., ATEBA, C.N. y KIHILA AKOACHERE, J.F.T., 2020. Pathogenic Potential and Antimicrobial Resistance Profile of *Staphylococcus aureus* in Milk and Beef from the Northwest and Southwest Regions of Cameroon. *BioMed Research International*, vol. 2020. ISSN 23146141. DOI 10.1155/2020/6015283.

ARGUDÍN, M.Á., MENDOZA, M.C. y RODICIO, M.R., 2010. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, vol. 2, no. 7, pp. 1751-1773. ISSN 20726651. DOI 10.3390/toxins2071751.

ARIZA, C., 2006. *Estandarización Y Verificación De Los Métodos Analíticos Alternativos Usados En Calidad En La Compañía Productos*. S.l.: Universidad de la Salle (Colombia).

BASU, S., BOSE, C., OJHA, N., DAS, NABAJITDAS, J., PAL, M. y KHURANA, S., 2015. Evolución de medios de crecimiento bacterianos y fúngicos. *PubMed*, vol. 11 (4), pp. 182. DOI 10.6026 / 97320630011182.

BONIFAZ GARCÍA, N. y REQUELME, N. de J., 2011. Buenas prácticas de ordeño y la calidad higiénica de la leche en el Ecuador. *La Granja*, vol. 14, no. 2, pp. 45. ISSN 1390-3799. DOI 10.17163/lgr.n14.2011.04.

BUSTAMANTE, V., MEZA, P., ROMÁN, J.C. y GARCÍA, P., 2014. Evaluación de un sistema automatizado de siembra de orinas para urocultivos. *Revista chilena de infectología*, vol. 31, no. 6, pp. 670-675. ISSN 0716-1018. DOI 10.4067/s0716-10182014000600005.

CADENA-HERRERA, D., ESPARZA-DE LARA, J.E., RAMÍREZ-IBAÑEZ, N.D., LÓPEZ-MORALES, C.A., PÉREZ, N.O., FLORES-ORTIZ, L.F. y MEDINA-RIVERO, E., 2015. Validation of three viable-cell counting methods: Manual, semi-automated, and automated. *Biotechnology Reports* [en línea], vol. 7, pp. 9-16. ISSN 2215017X. DOI 10.1016/j.btre.2015.04.004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2015.04.004>.

CAMPUZANO, S., MEJÍA, D., MADERO, C. y PABÓN, P., 2015. Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C. *Techniques, Sciences, Methodes*, vol. 7-8, pp. 3-8.

CÁRDENAS, C. y MURILLO, M., 2018. *Calidad Bacteriológica de la leche cruda en ganaderías de la provincia del Azuay*. S.l.: Universidad de Cuenca (Ecuador).

CARRASCO, J. y OBAND, A., 2013. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂) EN LECHE FRESCA COMERCIALIZADA EN EL DISTRITO DE CHICLAYO, MAYO - NOVIEMBRE 2013. *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 53, no. 9, pp. 1689-1699. ISSN 1098-6596.

CLSI, 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; *Clinical and Laboratory Standards Institute*, vol. 32, no. 3, pp. 1-184.

CORRAL-LUGO, A., MORALES-GARCÍA, Y.E., PAZOS-ROJAS, L.A., RAMÍREZ-VALVERDE, A. y MUÑOZ-ROJAS, J., 2012. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XIV, no. 2, pp. 147-156. ISSN 0123-3475.

CORRAL, A. et al S., 2012. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo”. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 14, no. 2, pp. 147-156. ISSN 1909-8758.

CORRAL, A., MORALES, Y., PAZOS, L., RAMÍREZ, A. y MUÑOZ, J., 2012. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XIV, no. 2, pp. 147-156. ISSN 0123-3475.

CUESTA, A., 2010. INTRODUCCION A LA VALIDACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS Norma ISO 17025. .

DE LA FUENTE, N., VILLARREAL, J., DÍAZ, M. y GARCÍA, A., 2015. Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista Mexicana de las Ciencias Farmaceuticas*, vol. 46 (2), pp. 7-16.

DÍAZ, A., BARRIO, M. del P., DARRÉ, M., LÓPEZ, M., COFRE, M., CONDORÍ, M., LAZARTE, D., TREVISÁN, V., PEIRANO, C., DEL BÓ, C., CAÑATE, A. y ALCAIDE, C., 2014. *Análisis Microbiológico De Los Alimentos Microorganismos Indicadores*. S.l.: s.n.

FAO y OMS, 2018. Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre La Gestión de Riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios. *Codex Alimentarius, Normas Internacionales de los Alimentos*. USA: s.n., pp. 45.

FUENTES, G. et al S., 2013. Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación. *Agricultura Sociedad y Desarrollo*, vol. 10, no. 4, pp. 419. ISSN 1870-5472. DOI 10.22231/asyd.v10i4.134.

GEISSMANN, Q., 2013. OpenCFU, a New Free and Open-Source Software to Count Cell Colonies and Other Circular Objects. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 2, pp. 1-10. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0054072.

HAAG, A.F., ROSS FITZGERALD, J. y PENADÉS, J.R., 2019. Staphylococcus aureus in animals. *Gram-Positive Pathogens*, vol. 7, no. January, pp. 731-746. DOI 10.1128/9781683670131.ch46.

HO, J., BOOST, M. V y DONOGHUE, M.M.O., 2020. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . , no. January.

INEN, 2012. Instituto ecuatoriano de normalización- Norma Técnica Ecuatoriana Nte Inen 9:2012 Leche Cruda. Requisitos. *Leche Cruda. Requisitos*. S.l.: s.n., pp. 1-7.

ISHAG, K.H.M., 2015. Risk Analysis of Investments In-Milk Collection Centers. *Sustainable Agriculture Research*, vol. 4, no. 2, pp. 104. ISSN 1927-050X. DOI 10.5539/sar.v4n2p104.

JIMA, Y., 2015. *VALIDACIÓN DEL MÉTODO MICROBIOLÓGICO PARA DETERMINAR EL ÁCIDO FÓLICO EN UN LECTOR ELISA*. S.l.: s.n.

LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA, 2003. Introducción al control de calidad de la leche cruda. , pp. 24.

MARTÍNEZ-VASALLO, A., RIBOT-ENRÍQUEZ, A., VILLOCH-CAMBAS, A., MONTES DE OCA, N., REMÓN-DÍAZ, D. y PONCE-CEBALLO, P., 2017. Calidad e inocuidad de la leche cruda en las condiciones actuales de Cuba. *Revista de Salud Animal*, vol. 39, no. 1, pp. 51-61. ISSN 0253-570X.

MARTÍNEZ, A., RIBOT, A., VILLOCH, A., MONTES DE OCA, N., REMÓN, D. y PONCEO, P., 2017. Calidad e inocuidad de la leche cruda en las condiciones actuales de Cuba. *Revista de Salud Animal*, vol. 39, no. 1, pp. 51-61. ISSN 0253-570X.

MASHOUF, R.Y., HOSSEINI, S.M., MOUSAVI, S.M. y ARABESTANI, M.R., 2015. Prevalence of enterotoxin genes and antibacterial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal originated foods in West of Iran. *Oman Medical Journal*, vol. 30, no. 4, pp. 283-290. ISSN 20705204. DOI 10.5001/omj.2015.56.

MÁTTAR, S., CALDERÓN, A., SOTELO, D., SIERRA, M. y TORDECILLA, G., 2009. Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. *Revista de Salud Pública*, vol. 11, no. 4, pp. 579-590. ISSN 0124-0064. DOI 10.1590/s0124-00642009000400009.

MENDEZ, A., 2008. *Sistema automático para análisis de unidades formadoras de colonias mediante técnicas de procesamiento digital de imágenes*. S.l.: Universidad de Querétaro (México).

MINSA, 2005. Guía de validación de métodos analíticos. *Registro de productos de interés sanitario*.

MUHAIIRI, F., BULSHAWAREB, A., NUAIMI, A., HEMEIRI, M., AIYAN, A. y MOHTESHAMUDDIN, khaja, 2019. the Role of Antimicrobials in Food Animals in the Emergence of Resistant Human Pathogens. *International Journal of Medical Reviews and Case Reports*, vol. 3, no. 0, pp. 1. ISSN 2534-9821. DOI 10.5455/ijmrcr.role-antimicrobials-food-animals.

NARANJO, J., 2016. *Diseño e implementación de un sistema para la contabilización automática de unidades formadoras de colonia bacterianas: coliformes, mesófilos aerobios, bacilos, estafilococos y levaduras usando técnicas de visión artificial*. S.l.: Universidad de las Fuerzas Armadas (Ecuador).

OAA, 2013. Guía para la validación de métodos microbiológicos. *Organismo Argentino de Acreditación*, vol. 1, pp. 1-17.

OLORTEGUI, A. y SANTOS, S., 2019. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LECHE ENTERA EN EL HATO LECHERO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN 2016. S.l.: UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN (Perú).

OMS, 2014. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS, Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico. , pp. 1-83.

PARDO, J., 2019. Evaluacion de la calidad organoléptica y física-química de la leche bovina en el cantón quilanga. S.l.: Universidad Nacional de Loja (Ecuador).

PERALTA-TORRES, J., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, M., LÓPEZ-SEGOVIA, N., BOLDO-LEÓN, X., TRUJILLO-CASTILLO, L., QUIÑONEZ-DÍAZ, L., BETANCUR-ANCONA, D., BLE-CASTILLO, J. y OLVERA-HERNÁNDEZ, V., 2021. Estudio comparativo de calidad higiéno-sanitaria, fisicoquímica y microbiológica de leche bovina en el sureste mexicano. *Revista MVZ Cordoba*, vol. 26, no. 3, pp. 1-8. ISSN 19090544. DOI 10.21897/rmvz.2106.

PICAZO, J., 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. S.l.: s.n.

PYZ-LUKASIK, R., PASZKIEWICZ, W., TATAR, M.R., BRODZKI, P. y BELKOT, Z., 2015. Microbiological quality of milk sold directly from producers to consumers. *Journal of Dairy Science*, vol. 98, no. 7, pp. 4294-4301. ISSN 15253198. DOI 10.3168/jds.2014-9187.

QUIGLEY, L., O'SULLIVAN, O., STANTON, C., BERESFORD, T.P., ROSS, R.P., FITZGERALD, G.F. y COTTER, P.D., 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 37, no. 5, pp. 664-698. ISSN 01686445. DOI 10.1111/1574-6976.12030.

RAMÍREZ S, J.A., PARRA V., J.A. y ALVAREZ ALDANA, A., 2017. Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos. *Mente Joven*, vol. 6, pp. 01-08. ISSN 2323-0312. DOI 10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3665.

RIQUELME, V., 2015. VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella* spp. EN MATRICES DE ALIMENTOS. , pp. 1-28.

RODRÍGUEZ, D., 2019. *La cuantificación de un microorganismo probiótico (lactobacillus acidophilus la3) en yogur*. S.l.: s.n.

RODRÍGUEZ, R. y MUÑOZ, E., 2017. Frecuencia y Susceptibilidad Antimicrobiana de Bacterias Causantes de Mastitis en Bovinos de un Establo de Trujillo, Perú. , vol. 28, no. 4, pp. 994. ISSN 1609-9117. DOI 10.15381/rivep.v28i4.13874.

SÁNCHEZ, E. et al. S., 2017. Simulación y Conteo de Unidades Formadoras de Colonias. *ReCIBE*, vol. 6, no. 1, pp. 97-111.

SANCHÉZ, E., NUÑEZ, D., CRUZ, R., TORRES, M. y HERRERA, E., 2017. Simulación y conteo de unidades formadoras de colonias. *Redalyc. Revista médica de Chile*,

SÁNCHEZ, E.P., NÚÑEZ, D., CRUZ, R.O., TORRES, M.A. y HERRERA, E. V., 2017. Simulación y Conteo de Unidades Formadoras de Colonias. *ReCIBE*, vol. 6, no. 1, pp. 97-111.

SANZ, J., 2018. Creimiento microbiano- tipos de siembra. .

TAROCO, R., SEIJA, V. y VIGNOLI, R., 2008. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacterología y Virología Médica*, vol. 36, no. Cim, pp. 663-671.

TIJERINA, L., 2015. *Validación de un métodos basado en filtración por membrana para la deeción de patógenos bacterianos en melón y chile jalapeño*. S.l.: s.n.

UNIVERSIDAD DE LA PLATA, 2018. Aplicaciones para conteo de colonias en laboratorio. *Facultad de Ciencias Exactas*.

UNLP, 2018. Aplicaciones para conteo de colonias en laboratorio. *Espacio Pedagógico*.

USP, 2007. Farmacopea De Los Estados Unidos De America. . S.l.: s.n., pp. 62. ISBN 1-889788-48-X.

VÁSQUEZ CASTILLO, K., 2018. *Caracterización Fisicoquímica y Organoléptica de leche entera ultrapasteurizada (UHT) procesadas en las empresas lácteas establecidas en Nicaragua*. S.l.: Universidad Autónoma de Nicaragua (Managua).

VILLANUEVA, G.T. y MORALES, S.C., 2017. Resistencia antibiótica de patógenos

bacterianos aislados de mastitis clínica en bovinos de crianza intensiva. *Revista Electronica de Veterinaria*, vol. 18, no. 12. ISSN 16957504.

YOUNG, W., HINE, B.C., WALLACE, O.A.M., CALLAGHAN, M. y BIBILONI, R., 2015. Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. *PeerJ*, vol. 3, no. 2015, pp. 1-17. ISSN 21678359. DOI 10.7717/peerj.888.

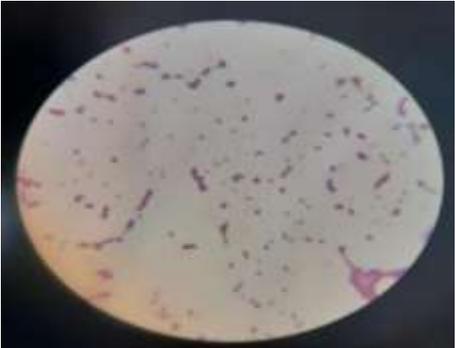
ZAMBRANO, JHON; GRASS, J., 2008. Valoración de la calidad higiénica de la leche cruda en la asociación de productores de leche de Sotará – asproleso, mediante las pruebas indirectas de resazurina y azul de metileno. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, vol. 6, no. 2, pp. 56-66. ISSN 1909-9959.

ANEXOS

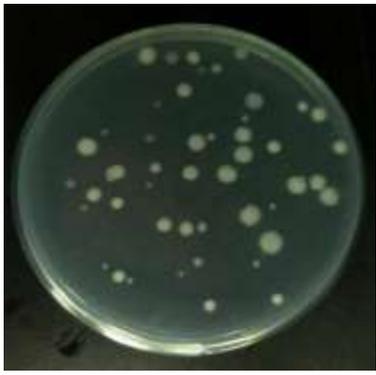
ANEXO A: PREPARACIÓN DE AGARES

Pesado de reactivos	Preparacion de agar Baird Parker
	 

ANEXO B: CARACTERIZACIÓN DE *S. aureus*

Identificación de colonias negras típicas y atípicas	Prueba de catalasa positiva
	
Tinción Gram: cocos Gram+ agrupados a manera de racimo	Prueba de manitol positiva: viraje de color rosado a amarillo
	

ANEXO C: RECUENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Dilución 10^{-3} : Muestra 2 Condamine	Dilución 10^{-4} : Muestra 3 Santa Rosa
 <p data-bbox="331 730 524 759">Serie 1: 60 UFC</p>  <p data-bbox="766 730 958 759">Serie 2: 62 UFC</p>	 <p data-bbox="1249 730 1442 759">Serie 1: 38 UFC</p>  <p data-bbox="1680 730 1872 759">Serie 2: 40 UFC</p>
Dilución 10^{-3} : Muestra 5 San Alfonso	Dilución 10^{-4} : Muestra 6 Santa Rosa
 <p data-bbox="331 1337 524 1366">Serie 1: 95 UFC</p>  <p data-bbox="815 1337 1008 1366">Serie 2: 96 UFC</p>	 <p data-bbox="1321 1327 1514 1356">Serie 1: 35 UFC</p>  <p data-bbox="1693 1327 1886 1356">Serie 2: 33 UFC</p>

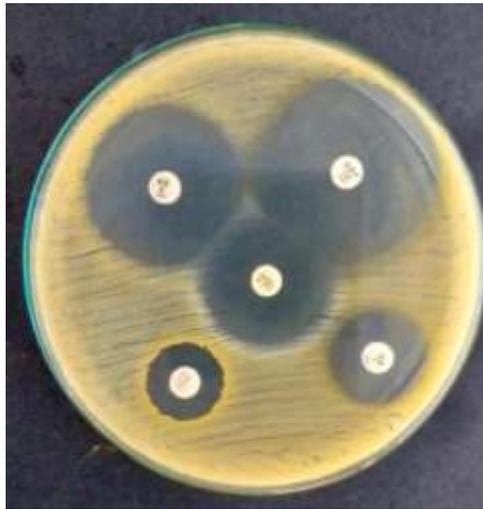
ANEXO D: SENSIBILIDAD BACTERIANA

Colocación de discos de sensibilidad en agar Mueller Hinton	Medición de halos de sensibilidad
	

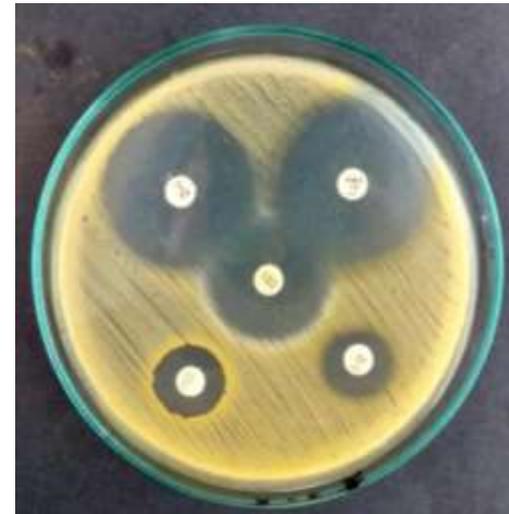
Cepa 2: discos de OX, RD, AMP, VA, TE



Serie 1

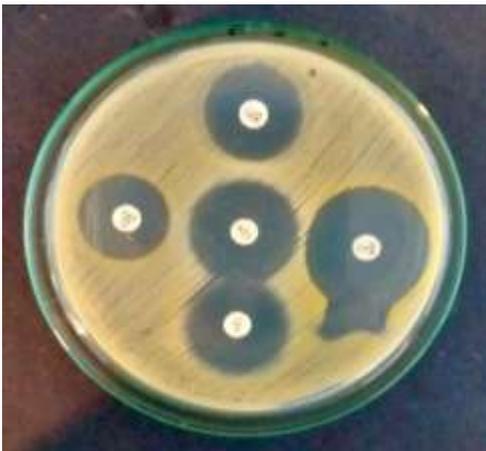


Serie 2



Serie 3

Cepa 2: discos de CN, CID, CAZ, C, E



Serie 1



Serie 2



Serie 3



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL APRENDIZAJE
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 29 / 11 / 2021

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: <i>María José Santander Coronel</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: <i>Ciencias</i>
Carrera: <i>Bioquímica y Farmacia</i>
Título a optar: <i>Bioquímica Farmacéutica</i>
f. Analista de Biblioteca responsable: <i>Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.</i>

**LEONARDO
FABIO MEDINA
NUSTE**

Firmado digitalmente por LEONARDO
FABIO MEDINA NUSTE
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC,
o=BANCO CENTRAL DEL ECUADOR,
ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE
INFORMACION-ECIBCE, l=QUITO,
serialNumber=0000621485,
cn=LEONARDO FABIO MEDINA NUSTE
Fecha: 2021.11.29 17:03:20 -05'00'



2149-DBRA-UTP-2021