

**ESTUDIO DE CALIDAD DE LECHE REALIZADO DURANTE LA PASANTÍA EN
DOS LABORATORIOS DE LA CIUDAD DE BOGOTÁ D.C**



Juanita Sofía Garzón Gil

**Universidad Antonio Nariño
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Bogotá D.C, Colombia
2023**

**ESTUDIO DE CALIDAD DE LECHE REALIZADO DURANTE LA PASANTÍA EN
DOS LABORATORIOS DE LA CIUDAD DE BOGOTÁ D.C**



Juanita Sofía Garzón Gil

10511728542

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de;

Médico Veterinario

Director

MV, MSc, PhD Francisco Javier Vargas Ortiz

Universidad Antonio Nariño

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Bogotá D.C, Colombia

2023

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos	11
JUSTIFICACIÓN	12
Universidad Antonio Nariño Laboratorio de Ciencias Básicas-sede Circunvalar.....	12
Objetivos	13
Misión	13
Visión.....	14
Valores	14
Estructura organizacional.....	15
Consejo Nacional de la Calidad de la Leche y prevención de la Mastitis (CNLM)	15
Misión	16
Visión.....	16
MARCO TEÓRICO	17
Bacterias.....	17
Cultivo de bacterias.....	18
Medios de Cultivo.....	18
Agar en base sangre:	18
Agar eosina azul de metileno EMB de Levine:	19
Agar MacConkey:	19
Agar Bilis esculina:.....	19
Agar manitol salado:	20
Agar Nutritivo:.....	20
Producción de Catalasa:	20
Producción de Coagulasa:.....	21
Hemólisis	21
Hemólisis alfa α :	21
Hemólisis beta β :	21
Hemólisis gamma γ :	21
Siembra y aislamiento de bacterias	22
Técnicas de aislamiento:	22
Técnica por agotamiento en placa.....	22
Técnica masiva en placa:	23
Tinción de Gram	23
Calidad de Leche.....	24
Mastitis.....	25
Mastitis Clínica	25

Mastitis Subclínica.....	26
Bacterias causantes de la mastitis	26
Recuento de Células Somáticas	26
Recuento de Unidades Formadoras de Colonias	27
ACTIVIDADES REALIZADAS	28
ANÁLISIS DE LAS ACTIVIDADES	28
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES.....	48
RECOMENDACIONES	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

TABLA DE IMÁGENES

Figura 1	13
Universidad Antonio Nariño Laboratorio de Ciencias Básicas-sede Circunvalar.....	13
Figura 2.....	14
CNLM	14
Figura 3.....	20
Siembra de bacterias por técnica de agotamiento.....	20
Figura 4.....	20
Siembra de bacterias por técnica masiva.....	20
Figura 5.....	25
Proceso de conteo de células somáticas.....	25
Figura 6.....	27
Número de muestras procesadas por finca en el periodo 2023-1.....	27
Figura 7	27
Flujograma del Procesamiento de muestras para calidad de leche.....	27
Figura 8.....	29
Relación de UFC con RCS de la finca 1 en el periodo 2023-1.....	29
Figura 9	29
Relación de UFC con RCS de la finca 5 en el periodo 2023-1.....	29
Figura 10.....	30
Rangos de RCS y UFC de referencia en el CNLM.	30
Figura 11	30
Elementos para realizar el recuento de Unidades Formadoras de Colonias.....	30
Figura 12.....	31
Flujograma de Recuento de Unidades Formadoras de Colonias.....	31
Figura 13.....	32
Lámina Lactochip x4.	32
Figura 14.....	33
Flujograma de Recuento de Células Somáticas.....	33
Figura 15.....	34

Flujograma de Conservación, mantenimiento e identificación de bacterias.	34
Figura 16.....	34
Clasificación de las bacterias según tinción Gram y hemólisis.	34
Figura 17.....	35
Contaminación en las cajas de Petri por hongos u otras bacterias.	35
Figura 18.....	36
Autoclave en zona verde indicando que la esterilización llegó al nivel deseado.....	36
Figura 19.....	38
Técnica de agotamiento en caja de Petri.....	38
Figura 20.....	39
Técnica masiva en caja de Petri.....	39
Figura 21.....	39
Hemólisis en 2 bacterias en caja de petri.	39
Figura 22.....	41
Elementos utilizados para realizar agar en base sangre.....	41
Figura 23.....	42
Agar MacConkey líquido y en caja de Petri con resultados de 3 bacterias.....	42
Figura 24.....	42
Agar EMB líquido y en caja de Petri con resultado de 3 bacterias.....	42
Figura 25.....	43
Agar Bilis esculina líquido y en caja de Petri con resultado después de inocular la bacteria.....	43
Figura 26.....	44
Cajas de Petri con Agar manitol antes de la siembra y después con resultados.	44
Figura 27.....	45
Secado de láminas de tinción de Gram de 3 bacterias.	45

RESUMEN

En la modalidad de pasantía, se desarrollaron actividades de apoyo y colaboración relacionadas a prácticas en el laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad Antonio Nariño, orientadas a la implementación de conocimientos adquiridos en el área de la microbiología de la Medicina Veterinaria donde se realizaron diferentes proyectos entre los que se encuentra específicamente el estudio de la "*Evaluación del efecto in vitro de la lisozima y el propóleo sobre bacterias causantes de mastitis en bovinos*". De la misma forma en el Consejo Nacional de la Calidad de la Leche y prevención de la Mastitis se realizaron

actividades de apoyo como el análisis de muestras de leche cruda para conocer la calidad de esta.

La importancia de conocer la calidad de la leche en laboratorio es de gran ayuda para garantizar un producto inocuo destinado principalmente al consumo humano, igualmente para identificar diferentes patógenos que se presentan en la glándula mamaria y que llegan a afectar la salud animal y la salud humana. Aunque está reglamentado que toda la producción de leche debería tener un programa de calidad e higiene, no está asegurado que en todas las fincas lo tengan implementado, llevando a cuestionarse si hay suficientes laboratorios disponibles y accesibles para todo el territorio en Colombia.

Los métodos utilizados para identificar la calidad de la leche principalmente fueron análisis de calidad de leche en el que incluye calidad composicional, calidad higiénica y montaje en agar para diferenciar las bacterias, gracias a este tiempo realizando las pasantías se obtuvo mucha experiencia, conocimiento y destreza que se pondrán en práctica en el futuro.

Palabras claves: microbiología, mastitis, laboratorio, calidad, Medicina Veterinaria.

ABSTRACT

In the internship modality, support and collaboration activities were developed related to practices in the laboratory of Basic Sciences of the Antonio Nariño University, oriented to the implementation of knowledge acquired in the area of microbiology of Veterinary Medicine where different projects were carried out, among which is specifically the study of the *"Evaluation of the in vitro effect of lysozyme and propolis on bacteria causing mastitis in cattle"*. Likewise, the National Council for Milk Quality and Mastitis Prevention carried out support activities such as the analysis of raw milk samples to determine the quality of raw milk.

The importance of knowing the quality of milk in the laboratory is of great help to guarantee a good product destined mainly for human consumption, as well as to identify different pathogens that occur in the mammary gland and affect animal and human health. Although it is regulated that all milk production should have a quality and hygiene program, it is not assured that all farms have it implemented, leading to question whether there are enough laboratories available and accessible to the whole territory in Colombia.

The methods used to identify the quality of the milk were mainly colony forming unit count, agar mounting to differentiate bacteria and milk quality analysis. Thanks to this time spent in the internships, a lot of experience, knowledge and skills were gained that will be put into practice in the future.

Keywords: microbiology, mastitis, laboratory, quality, Veterinary Medicine.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el Decreto 616 del 2006 expedido por el Ministerio de Salud y Protección Social, la leche está definida como “el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior”. (Ministerio de la Protección Social, 2006)

Por ser un alimento destinado al consumo humano y por su valor nutricional ya que es considerada un producto prioritario desde los primeros años de vida se debe asegurar la calidad del producto y la seguridad alimentaria.

Una leche de calidad es aquella que posee una composición (grasa, proteína, lactosa, vitaminas y minerales) de excelencia, que presenta recuentos microbianos bajos (higiénica), está libre de patógenos y no tiene contaminantes físico-químicos. Una leche de calidad es un requisito indispensable para el logro de productos de buena calidad, donde el hato es el primer condicionante para este proceso. (Carrascal A. et al, 2014)

Es por esto que el presente trabajo se desarrolló con el propósito de describir los procedimientos que se utilizaron para la identificación de la calidad de la leche cruda en el laboratorio de la Universidad Antonio Nariño y el Consejo Nacional de la Calidad de la Leche y prevención de la Mastitis.

Las muestras que se utilizaron fueron enviadas directamente de las fincas o recogidas por el laboratorio, para garantizar la recolecta adecuada de éstas, para procesarlas se realizó inmediatamente después de la llegada de las muestras para evitar que pase mucho tiempo entre la recolecta y el momento de procesarlas.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Describir procedimientos usados para la identificación de calidad de la leche durante la pasantía realizada en el laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Antonio Nariño y el Consejo Nacional de la Calidad de la Leche y prevención de la Mastitis (CNLM).

Objetivos específicos

- Aplicar los conocimientos teóricos aprendidos durante la carrera de Medicina Veterinaria en las actividades relacionadas a la evaluación de la calidad de la leche a nivel de laboratorio.
- Procesar muestras de leche cruda para el análisis de la calidad de leche e higiene en el laboratorio CNLM.
- Distinguir bacterias causantes de mastitis aisladas de muestras de leche cruda, por medio de descripción microscópica, macroscópica, tipo de hemólisis y calidad de leche en el laboratorio de ciencias básicas de la UAN.

JUSTIFICACIÓN

Se elige el laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Antonio Nariño ya que al realizar el trabajo práctico en ésta área aumentará la capacidad de análisis y responsabilidad correlacionando los métodos diagnósticos con casos clínicos de la vida profesional.

Además este laboratorio cuenta con un modelo de calidad, seguridad y está equipado con variedad de equipos de altos estándares contribuyendo a desarrollar la pasantía con éxito garantizando la seguridad de estudiantes y el personal ya que se estaría manipulando microorganismos contaminantes.

El estudio de calidad de la leche tiene una importancia fundamental para la producción de una leche y productos lácteos que sean inocuos e idóneos para el consumo.

Al finalizar la pasantía se espera tener más destreza y experiencia en el procesamiento de métodos y técnicas diagnósticas que se aprendieron de forma teórica durante la carrera de Medicina Veterinaria que servirán para resolver casos clínicos del futuro.

DESCRIPCIÓN DE LA INSTITUCIÓN

Universidad Antonio Nariño Laboratorio de Ciencias Básicas-sede Circunvalar

La Universidad Antonio Nariño pertenece al sector de educación superior de Colombia, es una entidad privada con varias sedes a nivel nacional y sede principal en Bogotá D.C, tiene laboratorios que cuentan con los insumos, materiales y equipos necesarios y suficientes para ofrecerles a los estudiantes ambientes de trabajo adecuados para el desarrollo de actividades prácticas.

Objetivos

1. Acreditar los programas de pregrado y postgrado de acuerdo con las disposiciones gubernamentales nacionales e internacionales a un mínimo plazo.

2. Ampliar las oportunidades de acceso a quienes en ejercicio de la igualdad de oportunidades, demuestren poseer las capacidades requeridas y cumplan las condiciones académicas exigidas. Igualdad de oportunidades que se vea reflejada no sólo en el acceso sino en la posibilidad de concluir los ciclos de formación en educación superior.

3. Propiciar condiciones, académicas y de bienestar, para que cada miembro de la comunidad educativa complete y cualifique su proyecto de vida de manera que posibilite su plena realización personal. (UAN, 2013)

Misión

La **Universidad Antonio Nariño** como institución de educación superior en claro compromiso con el país se ha propuesto:

Formar ciudadanos idóneos y competitivos, éticos y humanistas, con pensamiento autónomo y crítico, y personas altamente calificadas y comprometidas con los procesos de transformación positiva del país, fundamentados en la incorporación, difusión, generación e innovación del conocimiento universal. (UAN, 2013)

Ejercer liderazgo educativo e investigativo, en ciencias, artes y tecnología, acorde con los procesos de globalización y adelantos científicos, que responda a los desafíos provenientes de los cambios locales, regionales, nacionales e internacionales.

Contribuir a la calidad y excelencia del talento humano mediante la formación académica e investigativa rigurosa que posibilite la creación y consolidación de grupos de investigadores que orienten el desarrollo científico, tecnológico, y artístico.

Contribuir a la democratización del conocimiento y promover la igualdad de oportunidades no sólo en el acceso sino en la posibilidad de concluir los ciclos de formación mediante la descentralización, la ampliación de la oferta educativa, la diversificación de programas, la generación de mecanismos de financiación y el establecimiento de sistemas de información.

Establecer los canales de comunicación con las comunidades y con sus líderes y gobernantes para realizar trabajos conjuntos que permitan la resolución de problemas, el mejoramiento de la calidad de vida y la generación de proyectos que procuren la satisfacción de las necesidades y anhelos de cambio.

Identificar nuevos escenarios, metas y perspectivas que permitan vislumbrar un proyecto futuro de localidad, región y país y trabajar para su realización. (UAN, 2013)

Visión

Posicionarse como una de las mejores universidades del país, con pensamiento crítico, autónomo y global, acreditada nacional e internacionalmente, que al estar a la vanguardia del conocimiento, contribuye a la competitividad nacional en ciencias, artes y tecnología, es el reto de la Universidad Antonio Nariño. (UAN, 2013)

Valores

La Universidad Antonio Nariño se caracteriza por los siguientes valores: Participación, Autonomía, Lealtad, Confianza, Honestidad, Integridad. (UAN, 2013)

Estructura organizacional

Se encuentra en primer lugar vicerrectoría administrativa, seguido la oficina de gestión administrativa de sedes, oficina de logística, oficina de calidad & procesos y para finalizar está la oficina de infraestructura física, esta se ramifica en tres grandes grupos:

Primero la dirección financiera en el que se encuentran el departamento de contabilidad, crédito y cartera, inventarios y tesorería.

El segundo es la dirección de gestión humana en la que se encuentra el departamento de administración recurso humano y departamento de desarrollo humano.

El tercero encontramos la dirección TIC en la que se encuentra el departamento del centro de apoyo a la educación virtual, el departamento de servicios administrativos y financieros, el departamento de servicios de hardware y software, departamento de servicios

de redes y comunicaciones e infraestructura, el departamento de sistemas de información para la investigación y el departamento de la universidad virtual. (UAN, 2013)

Figura 1

Universidad Antonio Nariño Laboratorio de Ciencias Básicas-sede Circunvalar



Nota. Fuente: (Balcazar L. 2023)

Consejo Nacional de la Calidad de la Leche y prevención de la Mastitis (CNLM)

El (CNLM) ubicado al norte de la ciudad de Bogotá D.C - Colombia en la Calle 120A No 7-21, consta de una planta en el primer piso dividida en dos áreas de trabajo, la primer zona es el área de trabajo administrativo, la segunda zona es el área práctica donde tienen varios equipos e insumos para el procesamiento de las muestras de leche.

Es una organización interdisciplinaria de carácter científico sin ánimo de lucro, que propende por el mejoramiento de la calidad de leche y el control de la mastitis. En él confluyen los sectores profesional, industrial, productor, proveedor de insumos y académico. CNLM (2023)

Misión

El CNLM es una entidad interdisciplinaria, basada en el acompañamiento técnico-científico que promueve la calidad en los procesos de obtención y transformación de la leche, en los diferentes eslabones de la cadena con el propósito de contribuir a la seguridad alimentaria

a través de la investigación participativa, consultoría y socialización del conocimiento. CNLM (2023)

Visión

El CNLM en el 2025 seguirá fortaleciendo su reconocimiento nacional e internacional como una entidad líder, en la formulación de lineamientos e implementación de programas conducentes a promover la calidad de la leche y la seguridad alimentaria en la cadena productiva. CNLM (2023)

Figura 2
CNLM



Nota. Fuente: Elaboración propia, CNLM

MARCO TEÓRICO

Bacterias

Las bacterias son células procariotas vivientes pequeñas (0.1 a 10 μm). Tienen una membrana citoplásmica rodeada por una pared celular; el peptidoglicano, que es un polímero entretejido de naturaleza única, hace que la pared sea rígida. Las bacterias no poseen núcleo,

se dividen mediante fisión binaria y se pueden criar en cultivos artificiales, a menudo en menos de un día. Las principales formas que adoptan son esferas, bastones o espirales.

Las esferas son denominadas cocos y se organizan en racimos o cadenas, los bastones se denominan bacilos y pueden ser rectos o curvos y los espirales pueden ser rígidos o flexibles. (Ryan K.J., Ray C., 2017, cap. 21, pág. 267)

Clasificación según pared celular:

- Pared celular gramnegativa con una cantidad de peptidoglicanos muy reducida y se tiñe de rosa, debido a que el colorante fucsina es el que se adhiere a la pared celular.
- + Pared celular grampositiva mayor cantidad de peptidoglicanos y se tiñen de violeta, debido a que el colorante cristal violeta queda en el peptidoglicano. (Ryan K.J., Ray C., 2017, cap. 21, pág. 267).

Cultivo de bacterias

La propagación e identificación del agente infectante in vitro suele ser el medio más sensible y específico de diagnóstico y, por ende, es el método más comúnmente utilizado. En teoría, la presencia de un solo organismo vivo en la muestra puede arrojar un resultado positivo.

Una sola bacteria colocada en las condiciones de cultivo apropiadas se multiplicará en cantidades suficientes para que se perciban a simple vista.

Los medios bacteriológicos son recetas similares a sopas preparadas a partir de proteínas animales o vegetales suplementadas con nutrientes tales como glucosa, extracto de levadura, suero o sangre para satisfacer los requisitos metabólicos del organismo. Su composición química es compleja y su éxito depende de que cumplan con los requisitos nutricionales. (Ryan K.J., Ray C., 2017, cap.4, pág. 53)

Medios de Cultivo

Agar en base sangre:

Es el medio base por excelencia enriquecido para el aislamiento, cultivo y detección de la actividad hemolítica de microorganismos exigentes.

La infusión de corazón y la peptona de carne son fuentes ricas de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El cloruro de sodio proporciona electrolitos esenciales para el transporte y el balance osmótico. El agar bacteriológico es el agente solidificante. La adición de sangre desfibrinada al 5-10% a una base de agar nutritivo potencia el crecimiento de algunas bacterias, tales como estreptococos. A menudo, esto arroja colonias distintivas y proporciona un sistema indicador para la hemólisis.

(Ryan K.J., Ray C., 2017, cap. 4, pág. 72)

Agar eosina azul de metileno EMB de Levine:

Es un medio selectivo diferencial para bacterias gram negativas no exigentes. Los colorantes contenidos en el medio inhiben el crecimiento de las bacterias gram positivas, excepto el de enterococo. Con ello se permite la diferenciación de las enterobacterias fermentadoras de la lactosa (color violeta intenso) de las no fermentadoras color (grisáceas).

(Pastor. G, 2006, p. 30)

Agar MacConkey:

Es un medio selectivo debido a la incorporación de sales biliares y cristal violeta para aislar bacterias gram negativas no exigentes (enterobacterias). Contiene, además, lactosa y rojo neutro, por lo que permite diferenciar las colonias rojas características de las bacterias que atacan a la lactosa (*E. coli*, *Klebsiella*) de las que no la atacan que son incoloras. (Pastor. G, 2006, p. 30)

Agar Bilis esculina:

Es un medio que permite diferenciar los estreptococos de los enterococos, en este medio el enterococo transforma la esculina en esculetina y el medio adquiere una pigmentación negra. (L. E. Bautista, N.O. Stanchi, 2007 cap. 10, p. 66)

Agar manitol salado:

Es un medio selectivo usado para el aislamiento de estafilococos patógenos, especialmente *Staphylococcus aureus*, considerado un patógeno bacteriano serio desde que desarrolló resistencia a la penicilina en 1950.

El agar manitol salado incluye en su composición el indicador de pH: rojo fenol. Este indicador es de color rojo a pH 8,2 y cambia a amarillo a pH por debajo de 6,8. Cuando se desarrollan las colonias de *Staphylococcus aureus* fermentadoras de manitol, se produce ácido en el medio, el cual reacciona con el indicador y forma las áreas de color amarillo alrededor de las colonias, reacción característica de los estafilococos patógenos. (Durán A. et al., 2004)

Agar Nutritivo:

Es un medio utilizado para el aislamiento de microorganismos con pocas exigencias nutritivas. Dentro de las aplicaciones en que se utiliza está el cultivo, conservación de cepas, recuento de microorganismos y resistencia a antibióticos.

Contiene peptona de gelatina y extracto de carne que son la fuente que proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos. El agente solidificante es el agar bacteriológico. (MCD LAB, s.f.)

Producción de Catalasa:

La enzima Catalasa cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Cuando se coloca a una colonia en peróxido de hidrógeno, se puede observar la liberación del

oxígeno en la forma de burbujas de gas. La prueba es de particular utilidad en la diferenciación entre estafilococos (positivos) y estreptococos (negativos). (Ryan K.J., Ray C., 2017, cap. 4, pág. 72)

Producción de Coagulasa:

Es una técnica de laboratorio que se utiliza para poner en evidencia la presencia de la enzima coagulasa. Esta enzima tiene la propiedad de coagular el plasma y se utiliza para la diferenciación de especies del género *Staphylococcus*. Un resultado de coagulasa positivo indica que la muestra contiene *Staphylococcus aureus*. (UNAP, 2021)

Hemólisis

Muchos microorganismos son capaces de crecer en agar sangre y cuando lo hacen responden de diferente manera según realicen o no la lisis de los glóbulos rojos o hemólisis producida por la acción de una enzima llamada hemolisina. (Colom K. et al., 2021)

Hemólisis alfa α :

Se produce lisis parcial de los glóbulos rojos, se observa un halo de color verdoso alrededor de la colonia. Es debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina (compuesto de color verdoso) por el peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos. (Colom K. et al., 2021)

Hemólisis beta β :

Se produce lisis total de los glóbulos rojos, se observa un halo transparente o amarillo alrededor de la colonia. (Colom K. et al., 2021)

Hemólisis gamma y:

Hay ausencia de lisis de los glóbulos rojos, el medio de cultivo no presenta modificaciones de color y aspectos alrededor de la colonia. (Colom K. et al., 2021)

Siembra y aislamiento de bacterias

Técnicas de aislamiento:

Estas técnicas pretenden diluir la carga microbiana que se deposita sobre el medio de cultivo de forma que, en los últimos trazos de la siembra, haya tan pocas células que queden suficientemente separadas unas de otras y puedan desarrollar colonias independientes. (Colom K. et al., 2021)

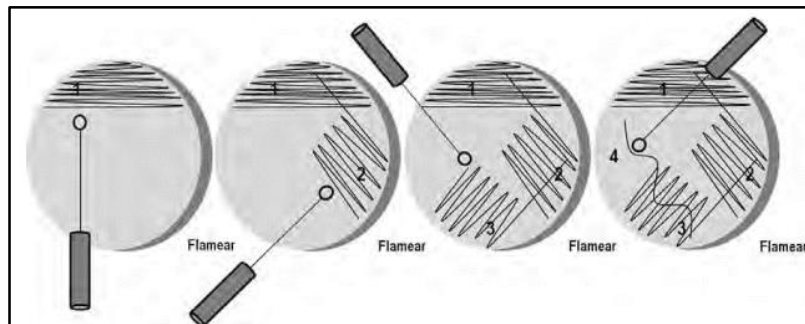
Técnica por agotamiento en placa

El medio agar nutritivo fundido se dejó a temperatura de 45°C y se vertió en la caja de Petri y se dejó solidificar.

Primero se colocó la muestra en la placa con un hisopo, asa o pipeta y se extendió de manera uniforme cerca de una cuarta parte de la superficie de la placa con un asa bacteriológica esterilizada. El asa se flamea para eliminar bacterias residuales y se realiza una serie de estriados superpuestos, flameando el asa entre cada uno. Después de incubarse durante la noche, se puede observar un crecimiento intenso en las áreas primarias, seguido de colonias aisladas. (Ryan K.J., Ray C., 2017, cap. 4, pág. 56)

Figura 3

Siembra de bacterias por técnica de agotamiento.



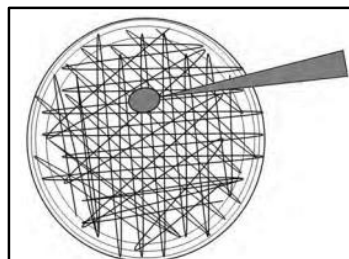
Nota. Fuente: Procedimientos de microbiología general (2021).

Técnica masiva en placa:

Colocar en un extremo de la placa la muestra de la bacteria y con el asa previamente flameada y fría, diseminar la muestra en toda la superficie de la placa sin dejar espacios en la placa. (L.E. Bautista, N.O. Stanchi, 2007, cap 10, pág. 66)

Figura 4

Siembra de bacterias por técnica masiva.



Nota. Fuente: Procedimientos de microbiología general (2021).

Tinción de Gram

Además de facilitar la observación de las bacterias, permite diferenciarlas en dos grupos grampositivas y gramnegativas, es la más utilizada y permite la diferenciación en formas, (redondeadas denominadas cocos y alargadas denominadas bacilos).

En la primera parte de la tinción la preparación se baña con violeta de genciana, quedando todas las bacterias teñidas de color violeta ultramar intenso. Al cubrirse posteriormente la preparación con una mezcla de alcohol y acetona algunas bacterias conservan dicha coloración mientras que otras se decoloran. Las que conservan la coloración violeta se denominan grampositivas y las que la pierden, gramnegativas. En la segunda parte de la tinción se hace actuar un colorante que contraste con el primero para teñir las bacterias gram negativas que han quedado decoloradas. Si se utiliza la fucsina diluida adquieren el color rosado. El carácter grampositivo (violeta intenso) o gramnegativo (rosa suave) de las bacterias depende de la estructura de su pared. (Pastor. G, 2006, p. 23)

Calidad de Leche

Una leche de calidad es aquella que posee una composición (grasa, proteína, lactosa, vitaminas y minerales) de excelencia, que presenta recuentos microbianos bajos (leche higiénica), está libre de patógenos y no tiene contaminantes físico-químicos. Una leche de calidad es un requisito indispensable para el logro de productos de buena calidad, donde el hato es el primer condicionante para este proceso.

Para obtener una leche de buena calidad, se debe empezar con producirla en buenas condiciones, conservarla adecuadamente en el hato mientras es recogida y transportarla en el menor tiempo posible. La producción se debe basar en cuatro principios básicos: animales de buena calidad, alimentación adecuada, estricta sanidad y buen manejo. Los dos primeros influyen en la calidad nutricional y los dos últimos en la calidad higiénica y sanitaria. (Carrascal et al., 2014).

Las propiedades químicas corresponden a los porcentajes de acidez, proteína, grasa, lactosa, sólidos no grasos y sólidos totales.

La acidez, es producida por el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas; que transforman la lactosa en ácido láctico, acético y propiónico. La proteína es el componente químico más importante de la leche por ser necesaria para los mamíferos que dependen en las primeras etapas de la vida y puede dividirse en dos grupos la caseína y proteínas del suero. La grasa, es otro de los componentes químicos de la leche y es la responsable no sólo del aroma y sabor; sino también de su textura. También es el componente más variable de la leche. (Calderón R. et al. 2007)

Los sólidos totales son la sumatoria de los porcentajes de las proteínas, de la grasa en emulsión, lactosa, vitaminas y sales. Por lo tanto, una disminución o aumento en alguno de estos constituyentes puede influenciar el contenido total de los sólidos; siendo el porcentaje de grasa, el factor que más influye en la sumatoria. La determinación del porcentaje de sólidos totales, reviste importancia en cuanto a la manera de detectar adulteraciones por aguado en la leche. (Calderón R. et al. 2007)

Mastitis

La mastitis bovina es una patología causada por una reacción inflamatoria de la glándula mamaria por la invasión de microorganismos a través del pezón, produciendo alteraciones físicas y químicas en la leche y en la ubre, aumento del número de células somáticas y finalmente cambios como es la pérdida de la funcionalidad. La enfermedad puede cursar como subclínica o como clínica. Clásicamente se la ha definido como una “enfermedad polifactorial”, porque el riesgo de infección depende de la habilidad de la vaca para combatirla, del tipo y patogenicidad de las bacterias presentes en un hato y, fundamentalmente, de las condiciones del medio ambiente y del manejo en general del ordeño en particular que se estén desarrollando en un establecimiento. (Corbellini, 1996)

Mastitis Clínica

La mastitis clínica es definida como una anormalidad en la glándula mamaria de la vaca o la leche, que puede ser fácilmente observada. Se caracteriza por la tumefacción o dolor en la ubre, enrojecimiento de la misma, la leche puede presentar una apariencia anormal y, en algunos casos, hay aumento de la temperatura, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además, las bacterias están presentes en la leche, lo que reduce el rendimiento y la calidad considerablemente. En los casos en que la inflamación de la ubre es acompañada de signos clínicos es diagnosticada entonces como mastitis clínica. (Cerquera et al., 2012)

Mastitis Subclínica

Este tipo de mastitis no presenta cambios visibles en la leche o ubre. Apenas se percibe una reducción en el rendimiento de la leche, siendo alterada su composición por la presencia de componentes inflamatorios y bacterias. (Cerquera et al., 2012)

Bacterias causantes de la mastitis

Las bacterias que causan la mastitis en bovinos, se pueden clasificar de manera general en:

- Contagiosas. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* y *Corynebacterium bovis*.
- Ambientales. *Escherichia coli*, *Enterobacterias*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* (considerado por algunos autores como contagioso) y *Staphylococcus aureus* (coagulasa negativos, considerados como oportunistas)
- Otras: Levaduras, hongos y otras bacterias como *Trueperella pyogenes*, *Nocardia spp*, *Brucella spp*, otras (Cerquera et al., 2012)

Recuento de Células Somáticas

Se basa en una técnica de microscopio de fluorescencia que cuenta células somáticas, utilizando una tinta fluorescente y la óptica LED, junto con la determinación de tamaño de 8 a 20 micras. Los elementos a utilizar para procesar muestras de leche cruda son:

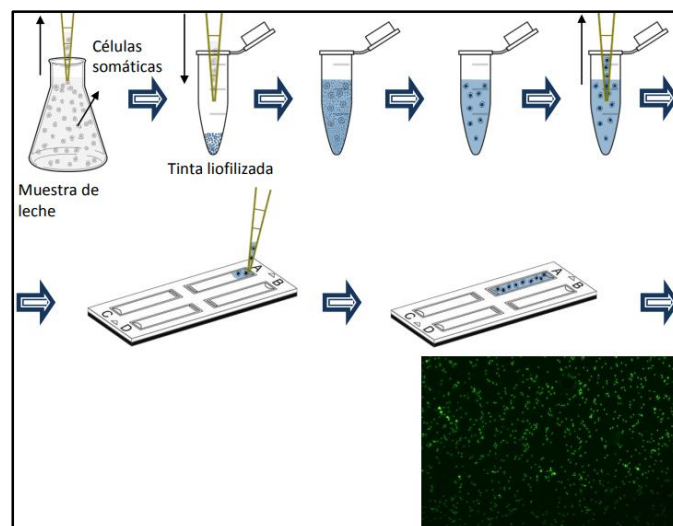
- Micropipetas manuales de 100 μ l y 10 μ l donde el volumen a aspirar es ajustable con un botón giratorio en la parte posterior conectado a un sistema análogo que confirma en una pantalla el volumen deseado.

- Lámina Lactochip x4, es una lámina estéril desechable que tiene 4 cámaras cerradas separadas identificadas con las letras A, B, C, D que permiten analizar 4 muestras diferentes, la capacidad de cada una de las cámaras es de 8 μ l y la máquina Lactoscan SCC realiza 16 fotografías de cada cámara (muestra) y después las analiza con un algoritmo específico.

- Tubos Eppendorf, puntas para micropipetas, gradilla, mezclador de vórtice, agitador tipo vórtice y productos para realizar la limpieza de la máquina. (LACTOSCAN COMBO Manual de Uso©, 2017)

Figura 5

Proceso de conteo de células somáticas.



Nota. Fuente: LACTOSCAN COMBO Manual de Uso© 2017 “Milkotronic” Ltd

Recuento de Unidades Formadoras de Colonias

Para obtener el recuento de UFC se utilizan los siguientes elementos:

- Compact Dry® TC total viable count
- 3 jeringas de 10 ml
- Suero fisiológico al 9% o Ringer Lactato
- Muestra de leche cruda

El recuento bacteriano es un métodos utilizado para determinar el número de microorganismos viables en un medio líquido, cuando las concentraciones son bajas a través de un medio de cultivo en placa de petri; los microorganismos retenidos en la membrana se desarrollan formando colonias, permitiendo su cuantificación. (Ramírez J., 2018)

ACTIVIDADES REALIZADAS

Consejo Nacional de la Calidad de la Leche y prevención de la Mastitis

1. Se procesó muestras de leche cruda y control lechero en el Consejo Nacional de la Calidad de la Leche y prevención de la Mastitis (CNLM).
 - Se realizó recolección y análisis de datos de campo.
 - Se procesó las muestras de leche cruda para obtener datos de calidad de leche como RCS y UFC.

Laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Antonio Nariño

2. Se realizó conservación, mantenimiento e identificación macroscópica de bacterias provenientes de mastitis en el Laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Antonio Nariño.

ANÁLISIS DE LAS ACTIVIDADES

Se procesó muestras de leche cruda y control lechero en el Consejo Nacional de la Calidad de la Leche y prevención de la Mastitis (CNLM).

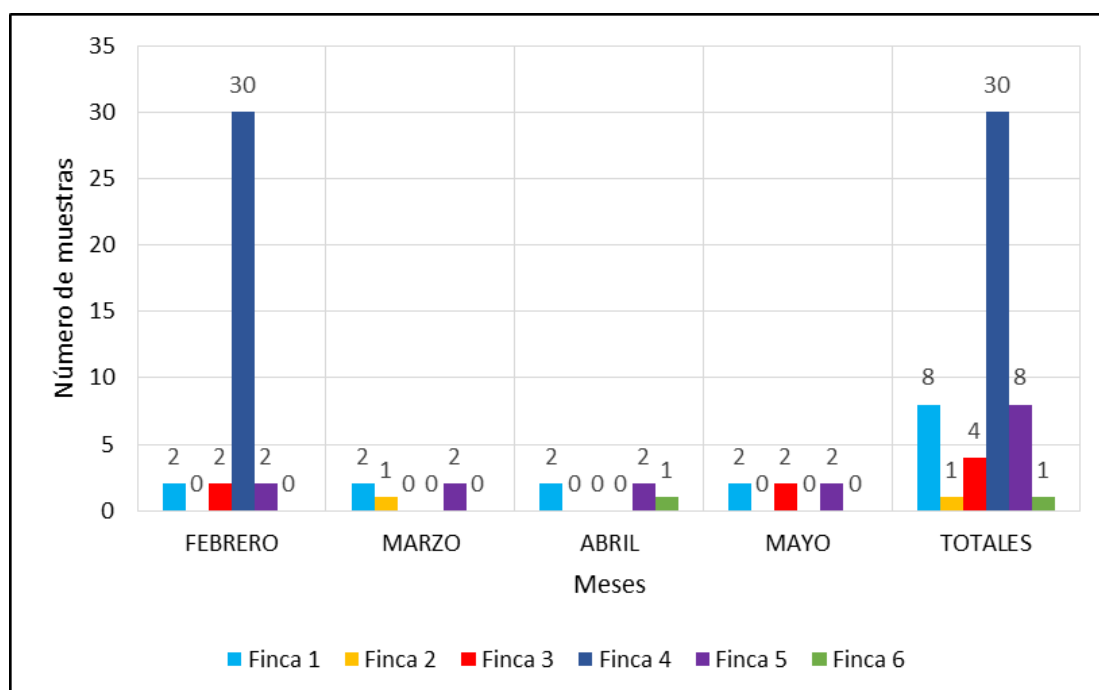
- Se realizó recolección y análisis de datos de campo.

Entre los que se encuentran: precio por litro de leche cruda, producción mensual de leche cruda y CMT mensual (número de vacas, cuartos perdidos y cuartos enfermos y el grado de afección).

Durante el periodo 2023-1 desde febrero a mayo se procesaron 52 muestras de leche cruda de 6 fincas en total, de éstas sólo 2 fueron constantes con el envío mensual de muestras y datos, respectivamente las fincas 1 y 5. (figura # 6)

Figura 6

Número de muestras procesadas por finca en el periodo 2023-1.

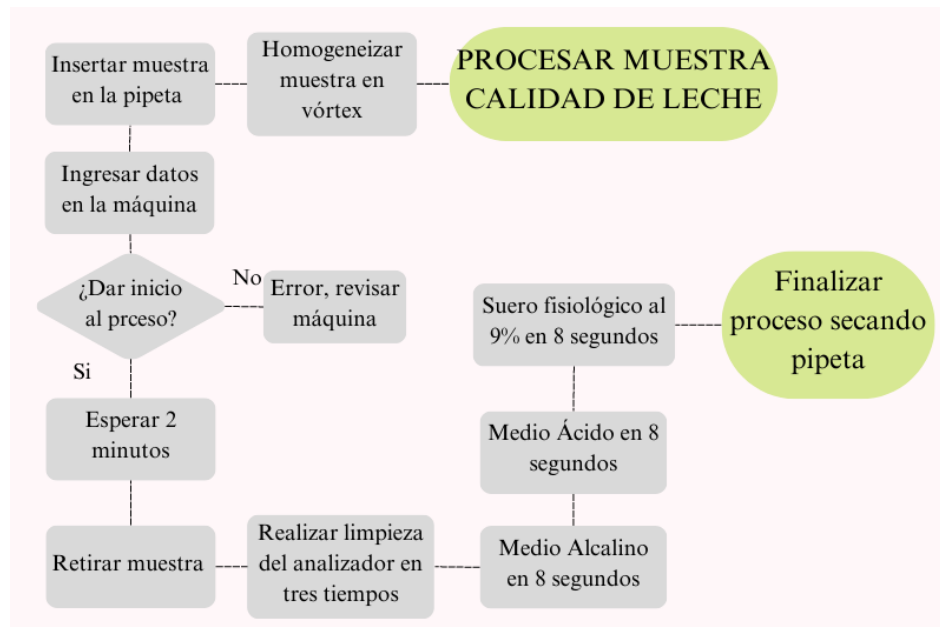


Nota. Fuente: Elaboración propia, CNLM

- Se procesaron muestras de leche cruda para obtener datos de calidad de leche como RCS y UFC.

Figura 7

Flujograma del Procesamiento de muestras para calidad de leche.



Nota. Fuente: Elaboración propia, CNLM

El análisis más completo se realizó de la finca 1 y finca 5, ya que se obtuvo toda la información de cada mes y se procesaron las muestras de leche cruda. En la finca 1 el promedio de UFC/ ml fue 93.750 clasificando la leche en regular mientras que el RCS/ ml fue de 162.750 clasificando la leche en excelente en cuanto a células somáticas. (Figura #8)

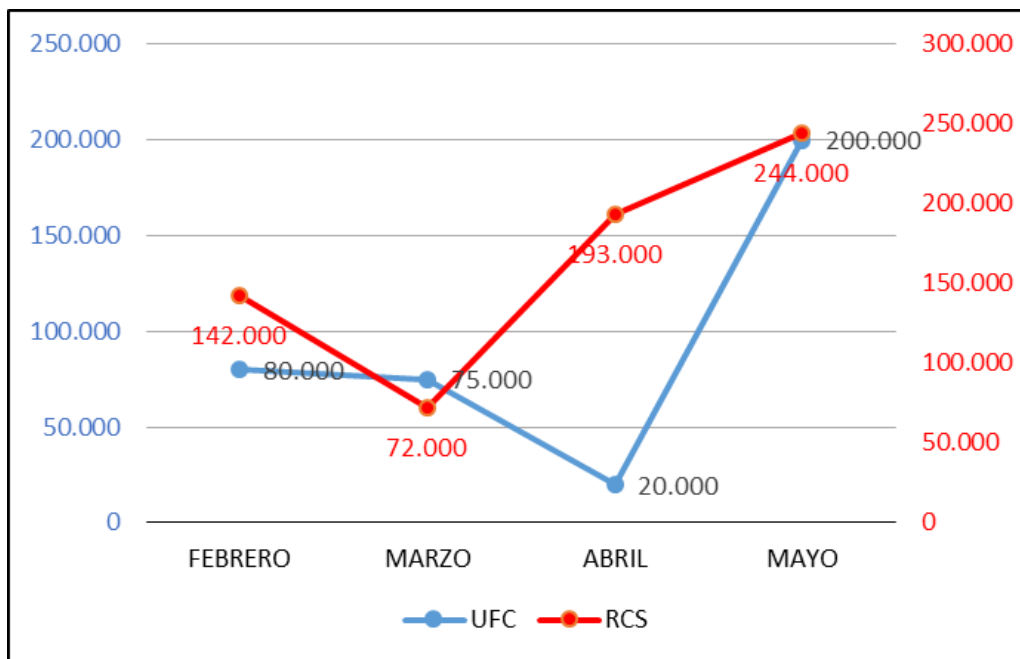
En cuanto a la finca 5 el promedio de UFC/ ml fue de 409.250 en la clasificación está por debajo de una leche de muy mala calidad higiénica, mientras que el RCS/ ml fue de 147.750 clasificando la leche en excelente. (Figura #9)

En ambas fincas hay una relación de los resultados donde las UFC están muy bajas mientras el RCS es excelente, esto podría darse por deficiencia en la higiene post ordeño,

inadecuado tiempo y temperatura de almacenamiento o transporte, contaminación ambiental o contaminación por recipientes. En ninguna de las dos muestras de leche el examen organoléptico estaba fuera de lo normal, a pesar de tener alto contenido de UFC ambas muestras presentaron olor, sabor, color y textura características de leche cruda normal.

Figura 8

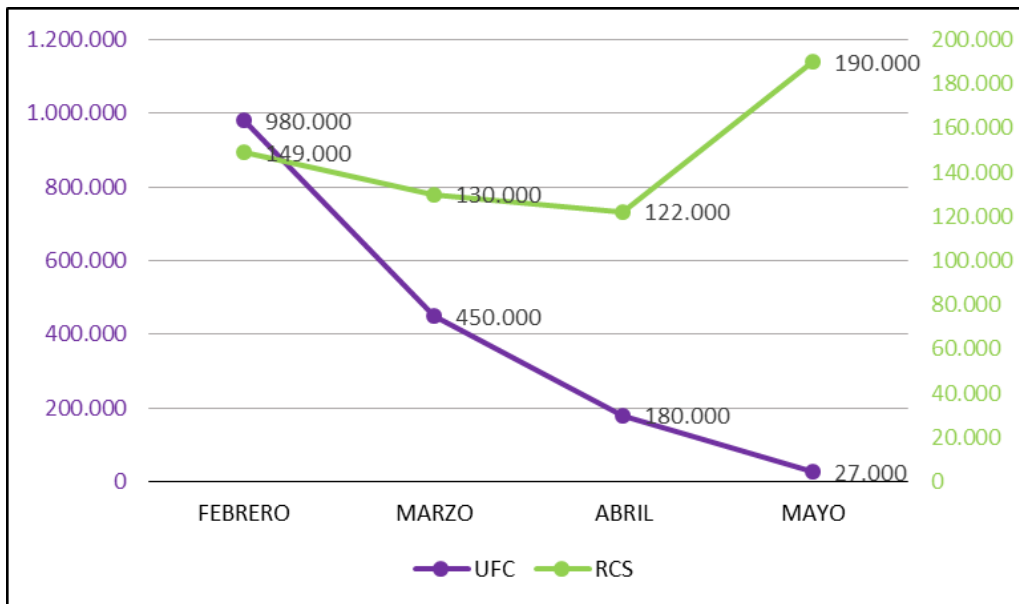
Relación de UFC con RCS de la finca 1 en el periodo 2023-1.



Nota. Fuente: Elaboración propia, CNLM

Figura 9

Relación de UFC con RCS de la finca 5 en el periodo 2023-1.



Nota. Fuente: Elaboración propia, CNLM

Figura 10

Rangos de RCS y UFC de referencia en el CNLM.

Valor		Clasificación
< a 200.000)	RCS/ ml	Excelente
entre [200.000 a 400.000)	RCS/ ml	Buena
entre [400.000 a 800.000)	RCS/ ml	Regular
> a 800.000	RCS/ ml	Mala

Valor		Clasificación
< a 20.000)	UFC/ ml	Excelente
entre [20.000 a 100.000)	UFC/ ml	Regular
entre [100.000 a 200.000)	UFC/ ml	Mala
> a 200.000	UFC/ ml	Muy mala

Nota. Fuente: CNLM

Recuento de Unidades Formadoras de Colonias:

Para obtener el recuento de UFC se utilizan los siguientes elementos:

- Compact Dry® TC total viable count
- 3 jeringas de 10 ml
- Suero fisiológico al 9% o Ringer Lactato
- Muestra de leche cruda

Figura 11

Elementos para realizar el recuento de Unidades Formadoras de Colonias.



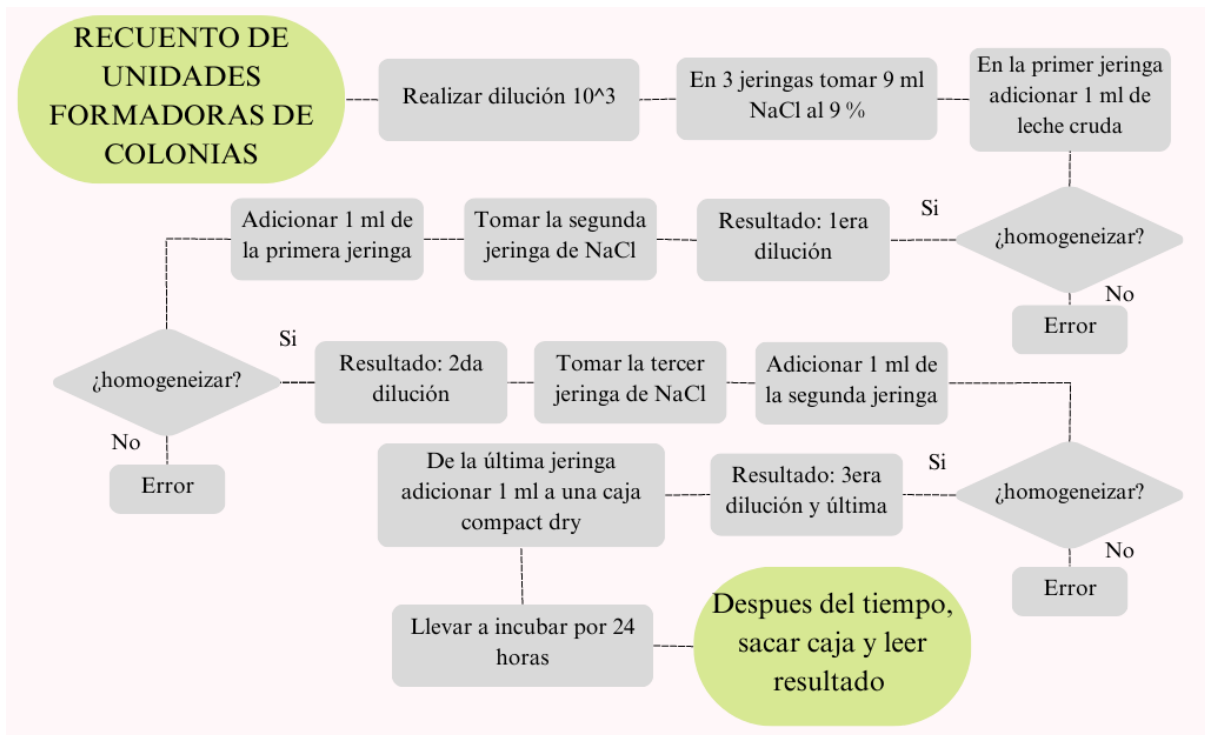
Nota. Fuente: Elaboración propia, CNLM

Pasos para realizar el procedimiento:

1. Se realiza una dilución de 10^3 tomando 9 ml de suero fisiológico al 9% en cada jeringa.
2. Con la jeringa #1 se toma 1 ml de la muestra de leche previamente homogeneizada y se diluye totalmente en los 9 mL de solución salina fisiológica.
3. Se toma la jeringa #2 con 9 mL de solución salina y se agrega 1 ml del contenido de la jeringa # 1 y se homogeneiza.
4. Con la jeringa #3 con 9 mL de solución salina y se agrega 1 ml de la jeringa #2 y homogeneiza, estos pasos garantizan una dilución de la leche 10^3 .
5. Se realiza la identificación en TC Compact dry con: nombre de la finca y cuántas diluciones se realizaron.
6. Para finalizar se deposita 1 mL de la jeringa # 3 en el TC Compact dry y se lleva a la incubadora por 24 horas mínimo o máximo 48 horas.

Figura 12

Flujograma de Recuento de Unidades Formadoras de Colonias.



Nota. Fuente: Elaboración propia, CNLM

Recuento de Células Somáticas:

Los elementos a utilizar para procesar muestras de leche cruda para el Recuento de Células Somáticas son:

- Micropipetas manuales de 100 μ l y 10 μ l
- Lámina Lactochip x4
- Tubos Eppendorf
- Puntas para micropipetas
- Gradilla
- Mezclador de vórtice - agitador tipo vórtex
- Productos para realizar la limpieza incluye (medio ácido, medio alcalino y solución salina al 9%)

Para contar las células somáticas la muestra se mezcla con el indicador fluorescente SOFIA GREEN. Con la micropipeta se toman los 100µl de leche y se mezclan con el indicador fluorescente, homogeneizando durante 10 segundos en un tubo Eppendorf, seguido; de la muestra ya mezclada se toman sólo 8µl y se depositan en una sola cámara de la lámina lactochip.

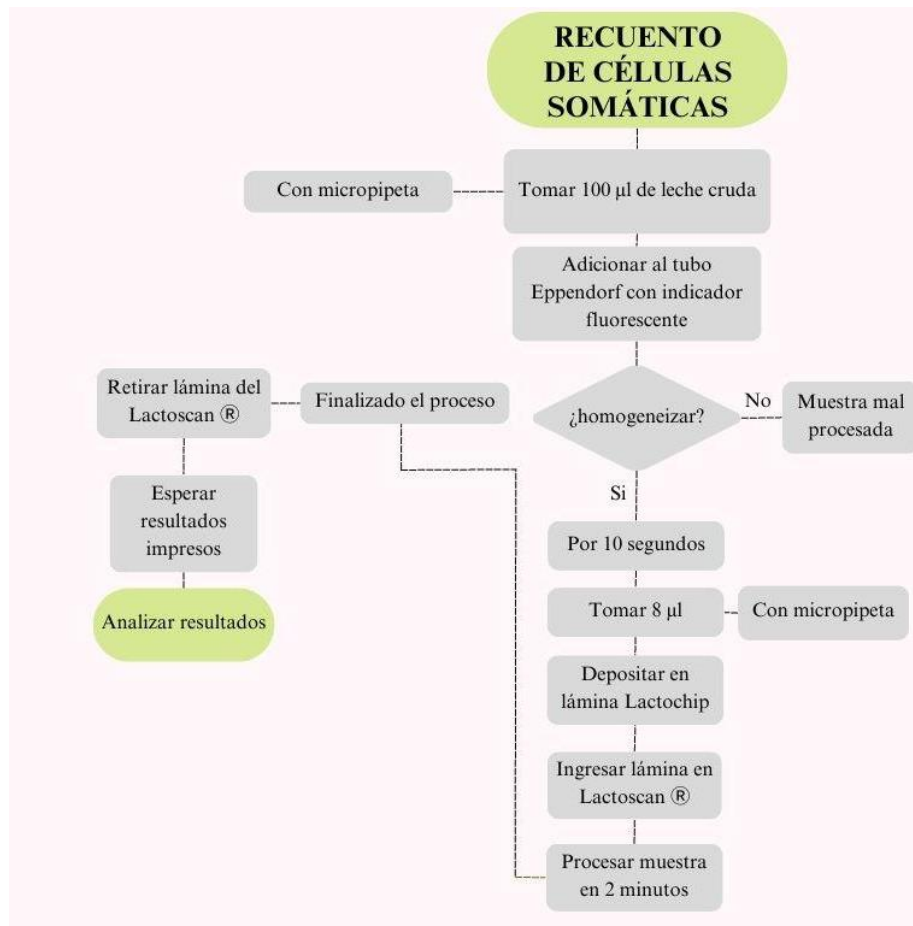
Figura 13

Lámina Lactochip x4.



Nota. Fuente: Elaboración propia, CNLM

Figura 14
Flujograma de Recuento de Células Somáticas.

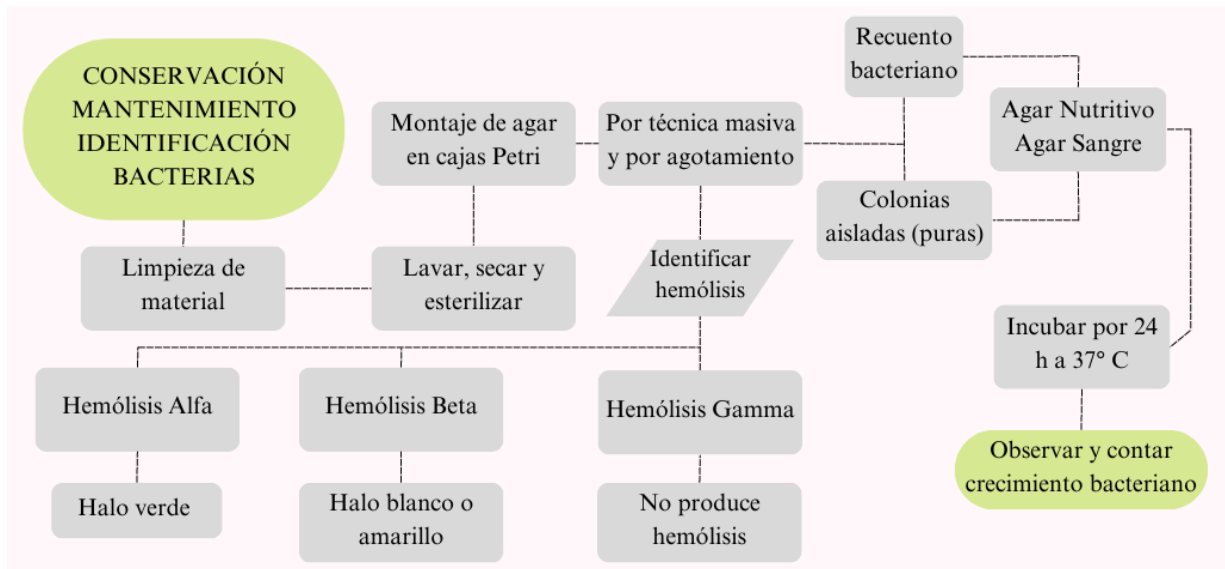


Nota. Fuente: Elaboración propia, CNLM

Conservación, mantenimiento e identificación macroscópica de bacterias provenientes de mastitis en el Laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Antonio Nariño.

Figura 15

Flujograma de Conservación, mantenimiento e identificación de bacterias.



Nota. Fuente: Elaboración propia, Laboratorio de ciencias básicas - UAN

Figura 16

Clasificación de las bacterias según tinción Gram y hemólisis.

Clasificación de las principales bacterias por tinción de Gram y Hemólisis				
Tinción Gram	Bacterias	H. Alfa	H. Beta	H. Gamma
Cocos Gram (+)	15	2	6	10
Bacilo Gram (-)	5	1	1	0

Nota. La clasificación de las bacterias es una aproximación, ya que durante el tiempo en que se estuvo ayudando en la pasantía no se alcanzó a confirmar la clasificación e identificación final de cada una de las bacterias. Fuente: Elaboración propia, Laboratorio de ciencias básicas - UAN

1. Se esterilizó y lavó el material sucio o contaminado:

Al realizar el descarte de las bacterias de cajas de Petri que ya no se utilizaban más y en presencia de contaminación en el agar o medio de cultivo, ya sea presencia de otras bacterias u hongos.

Figura 17

Contaminación en las cajas de Petri por hongos u otras bacterias.



Nota. Fuente: Elaboración propia, Laboratorio de ciencias básicas - UAN

Protocolo de esterilización para material sucio:

1. Insertar agua limpia hasta que el agua esté en contacto con el calefactor.
2. Conectar el autoclave a la corriente eléctrica para permitir el precalentamiento de ésta.
3. Retirar la cinta de enmascarar de identificación de cada material y depositar todo el instrumental a esterilizar en la posición correcta para permitir que el agar contaminado se derrita en la misma caja de Petri y no se riegue en la canasta del autoclave.
4. Cerrar de forma correcta y apretando las tuercas del autoclave para generar el sellado de la puerta.
5. Verificar que la válvula de presión esté en posición horizontal para evitar la salida del vapor y que la aguja del manómetro indicador de presión se encuentre en cero 0.
6. Durante el proceso verificar que la aguja del manómetro vaya aumentando la presión hasta llegar a la línea verde y apagar el autoclave.

La aguja del manómetro no debe llegar a la línea roja, ya que indica peligro por el exceso de presión.

7. Al finalizar el proceso se abre la puerta desenroscando las tuercas con guantes que resistan el calor y dejando salir el vapor.

8. Se retira la canasta y se saca el material con cuidado vertiendo el agar líquido en un envase plástico y el material de vidrio en un recipiente para el debido lavado.

Al agar líquido se le debe dar espera para que se gelifique y desecharlo en una bolsa roja debidamente marcada e identificada.

Figura 18

Autoclave en zona verde indicando que la esterilización llegó al nivel deseado.



Nota. Fuente: Elaboración propia, Laboratorio de ciencias básicas - UAN

Lavado de material sucio previamente esterilizado:

Se realizó el lavado de material con jabón exclusivo para implementos del laboratorio y con ayuda de esponjas de loza suaves que no dejen marcas en el vidrio del material para conservar la transparencia de éstos.

2. Se empacó el material limpio para el procedimiento de esterilización.

El material se empacó en papel periódico o papel blanco reciclado que no tuviera tinta por ambos lados ya que al poner papel con tinta en contacto con el vidrio por la temperatura del autoclave la tinta se traspasa a éstos interrumpiendo la transparencia del material.

Materiales que se esterilizaron en el autoclave:

- Cajas de Petri grandes y pequeñas de vidrio, de 20 ml y 10 ml respectivamente.
- Matraz de Erlenmeyer de vidrio.
- Beakers de vidrio.
- Tubos de ensayo de vidrio grandes, pequeños con y sin rosca.

Protocolo de esterilización para material limpio:

1. Al iniciar el protocolo de esterilización primero se verifica que el agua destilada se encuentre en los niveles adecuados.
2. Se conecta el autoclave a la corriente eléctrica y se enciende.
3. Se cubre la canasta de esterilización con papel periódico para que absorba el agua y humedad sobrante.
4. Se introducen todos los materiales empacados y en orden para realizar una carga llena de esterilización junto con el control de calidad.
5. Se cierra la puerta, con un poco de presión por unos segundos procurando dejar bien sellada la puerta.
6. Ajustar el reloj, y ciclo de esterilización que en la pantalla diga “Ciclo A”.
7. Esperar el tiempo indicado por el autoclave para esterilizar.
8. Al finalizar el proceso de esterilización se abre la puerta con cuidado dejando salir el vapor y se va retirando todo el material con guantes que soportan calor.
9. Dejar la puerta abierta para enfriar el autoclave e ir secando con un paño seco el restante de agua de la cámara, finalmente apagar el autoclave.

- 3. Se realizó el montaje del agar en cajas de Petri por dos técnicas para lectura de recuento bacteriano y tipo de hemólisis.**

Montaje del agar en cajas Petri:

Flamear el asa bacteriológica y tomar una muestra del cultivo, en una placa con agar extender la muestra siguiendo el esquema dependiendo si es por agotamiento o masiva, el recorrido del asa debe ser lo más largo posible con el fin de conseguir células aisladas que darán lugar a colonias. Al finalizar siempre se deben marcar las cajas de Petri con: nombre de la persona que realizó el pase, fecha, tipo de agar y nombre o número de identificación de la bacteria.

Técnica de agotamiento en placa:

Este es un procedimiento de dilución, lo que se quiso lograr al realizar esta práctica fue obtener colonias aisladas y puras en la última parte donde pasa el asa logrando identificar diferentes morfologías en el crecimiento de las colonias, tipos de hemólisis y obtener las bacterias libres de contaminación.

Figura 19

Técnica de agotamiento en caja de Petri.



Nota. Fuente: Elaboración propia, Laboratorio de ciencias básicas - UAN

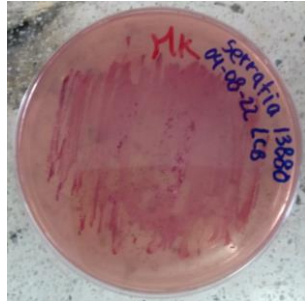
Técnica masiva en placa:

Este procedimiento se utilizó para obtener un gran número de colonias en la superficie del agar, se utilizó un hisopo o asa esteril, el cual se pasó por toda la superficie de la placa en todas las direcciones y por último por el borde del agar para que las bacterias crecieran de

forma uniforme, y se llevó a incubar por 24 horas. Al paso de este tiempo se sacaron de la incubadora y se realizó el conteo de colonias.

Figura 20

Técnica masiva en caja de Petri.



Nota. Fuente: Elaboración propia, Laboratorio de ciencias básicas - UAN

Tipo de hemólisis:

Hay tres tipos diferentes de hemólisis o tres formas donde se observa la destrucción de glóbulos rojos, que se pueden observar después de incubadas las bacterias:

- Hemólisis Alfa o parcial se ve un halo verde alrededor de la bacteria.
- Hemólisis Beta o completa se ve un halo amarillo o blanco alrededor de la bacteria y se presenta de forma mas grande alrededor de las colonias.
- Hemólisis Gamma no produce hemólisis.

Figura 21

Hemólisis en 2 bacterias en caja de petri.



Nota. Fuente: Elaboración propia, Laboratorio de ciencias básicas - UAN

4. Preparación de medios de cultivo:

➤ Agar Base Sangre

Es el medio utilizado cuando se requiere conocer la actividad hemolítica de las bacterias.

Al reverso del envase del agar trae las indicaciones para preparar un litro de medio de cultivo, pero siempre se realizaban los cálculos correspondientes para preparar la cantidad deseada.

El agar base viene deshidratado en polvo, por tanto debe disolverse en agua destilada en un erlenmeyer.

Teniendo los cálculos necesarios se adiciona primero la mitad del agua que se va a utilizar en un erlenmeyer del doble de la cantidad a preparar, por ejemplo, si se van a preparar 250 ml de agar base sangre se elige un erlenmeyer de 500 ml para prevenir que al llevar a ebullición el agar no se derrame, seguido se agrega el polvo y se homogeneiza lentamente hasta disolver el agar, finalmente se adiciona el agua restante.

Este se lleva a la plancha de calentamiento y agitación donde se espera que inicie ebullición, seguido se tapa el erlenmeyer con papel aluminio y se lleva a esterilizar al autoclave.

Al finalizar el proceso de esterilización se deja enfriar unos minutos a temperatura ambiente, tocando el erlenmeyer directamente con la piel hasta que llegue a una temperatura tolerable, cuando ya se encuentra en la temperatura ideal se le adiciona la sangre (también a temperatura ambiente) homogeneizando y rápidamente se sirve en las cajas de petri antes de que se gelifique el medio en el erlenmeyer.

El paso del agregado de la sangre es muy importante pues si se realiza cuando el medio está muy caliente los glóbulos rojos se romperán y el medio no servirá, y si se agrega demasiado

frío, se formarán grumos y la superficie del medio no quedará lisa para poder hacer el pase de bacterias correctamente.

Figura 22

Elementos utilizados para realizar agar en base sangre.



Nota. Fuente: Elaboración propia, Laboratorio de ciencias básicas - UAN

➤ **Agar MacConkey**

Este agar se utiliza para aislar enterobacterias gram negativas. Para interpretar se observa en la caja de Petri un cambio de color del medio: para las bacterias que fermentan lactosa cambia de rojo a rosado y produciendo una caída del pH resultando un medio ácido, Las colonias que no fermentan la lactosa permanecen incoloras o con un medio amarillo claro.

Figura 23

Agar MacConkey líquido y en caja de Petri con resultados de 3 bacterias.



Nota. Fuente: Elaboración propia, Laboratorio de ciencias básicas - UAN

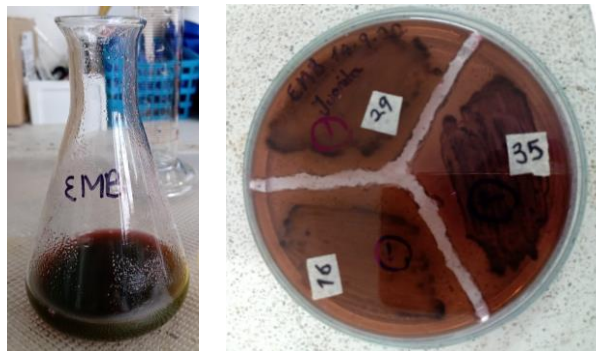
➤ **Agar EMB con Eosina y azul de metileno**

Este agar se utiliza para diferenciar las colonias de bacterias que fermentan lactosa de las que no.

Después de incubadas las cajas de Petri, se puede interpretar el resultado observando el cambio de color del medio, los coliformes producen colonias de color negro azulado, *Salmonella* y *Shigella* son incoloras o de color ámbar transparente y *Escherichia coli* pueden exhibir un brillo verde metálico característico debido a la rápida fermentación de la lactosa.

Figura 24

Agar EMB líquido y en caja de Petri con resultado de 3 bacterias.



Nota. Fuente: Elaboración propia, Laboratorio de ciencias básicas - UAN

➤ Agar Bilis esculina

Este agar se utiliza cuando se quiere aislar, identificar o confirmar sospecha de enterococos.

La interpretación se da cuando el agar adquiere una coloración oscura negra o café determinando positivo a Bilis esculina, si no hay cambio de color el resultado será negativo. La presencia de enterococos es un indicador de posible contaminación con heces fecales de la muestra.

Figura 25

Agar *Bilis esculina* líquido y en caja de Petri con resultado después de inocular la bacteria.



Nota. Fuente: Elaboración propia, Laboratorio de ciencias básicas - UAN

➤ Agar Manitol salado

Éste agar se utiliza cuando se sospecha de bacterias *Staphylococcus*, tiene en su composición un indicador de pH llamado rojo fenol, realiza un cambio de color por la variación del pH producido por la bacteria sembrada.

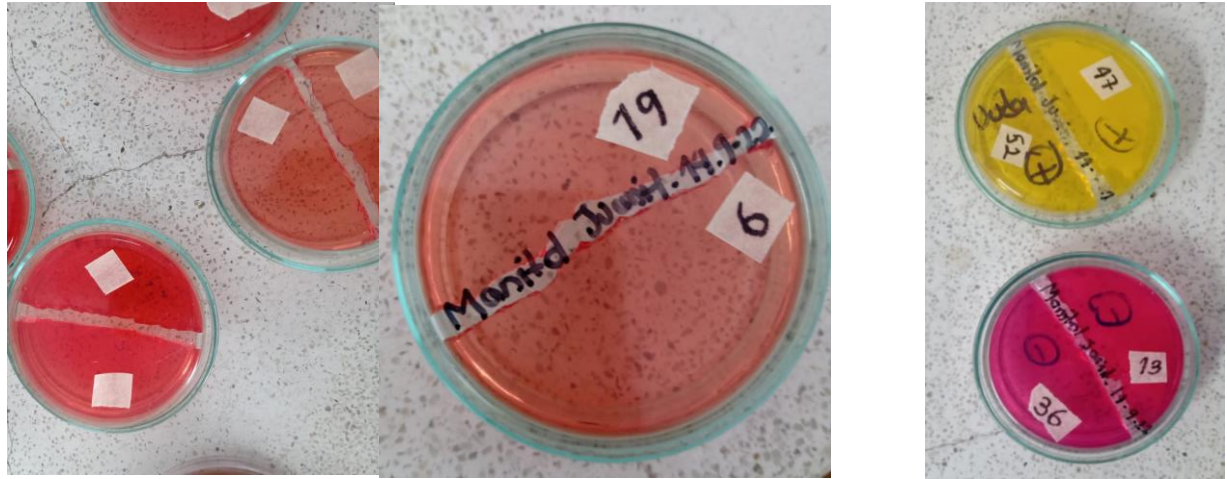
La interpretación se da cuando:

El medio cambia de color rojo claro a fucsia cuando la bacteria tiene un pH de 8.2 y a color amarillo cuando la bacteria tiene un pH de 6.8 o menos por ejemplo cuando se sospecha de *Staphylococcus aureus* fermentador de manitol productor de ácido en el medio.

Figura 26

Cajas de Petri con Agar manitol antes de la siembra y después con resultados.

Nota. Medio de cultivo de color rojo claro sin siembra de bacterias. Resultados de medios de cultivo de cuatro bacterias, se observa que las bacterias de la caja superior tienen resultados



positivos a *Staphylococcus* por el color amarillo, mientras las bacterias de la caja inferior dieron negativo por el color fucsia. Fuente: Elaboración propia, Laboratorio de ciencias básicas - UAN

5. Tinción de Gram

Al iniciar el proceso de tinción se deben tener todos los materiales previamente listo y en orden en que se van a utilizar, entre esos están, láminas portaobjetos, cronómetro, cinta de enmascarar, marcador sharpie y los tintes que los proporciona el laboratorio, primero se seleccionan el número de láminas necesarias teniendo en cuenta que caben dos bacterias por lámina, se debe marcar con cinta para enmascarar en el extremo de cada lámina como se observa en la imagen para no confundir bacterias.

Los pasos para realizar tinciones de Gram proporcionados por la microbióloga a cargo:

1. Esterilizar el asa en el mechero de Bunsen y dejar enfriar.
2. Tomar un poco de la bacteria con el asa.
3. En una lámina portaobjetos previamente marcada con la identificación de la bacteria se coloca una gota de solución salina.
4. Poner la bacteria en la gota de solución salina, homogeneizar y dejar secar.

5. Flamear la lámina entre 2-3 segundos para fijar la bacteria, seguido colocar la lámina en el soporte para tinciones.
6. Colocar Cristal violeta 1 minuto.
7. Lavar con agua corriente.
8. Colocar Lugol por 1 minuto.
9. Lavar con agua corriente.
10. Colocar alcohol acetona durante 40 segundos.
11. Lavar con agua corriente.
12. Colocar fuscina durante 1 minuto.
13. Lavar con agua corriente.

Al finalizar la tinción de todas las láminas se dejan secar a temperatura ambiente sobre una toalla absorbente, para finalizar se observan en el microscopio describiendo y clasificando las bacterias.

Figura 27

Secado de láminas de tinción de Gram de 3 bacterias.



Nota. Fuente: Elaboración propia, Laboratorio de ciencias básicas - UAN

DISCUSIÓN

Se resalta la importancia de tener implementado de forma rutinaria un programa que evalúe la calidad e higiene de la leche cruda, ya que esto refleja la salud de los bovinos y de las fincas en general pues una buena calidad genera menor descarte de leche por mastitis, menor cantidad de animales enfermos crónicos y menos animales para descarte.

Analizando los resultados obtenidos de las fincas, se destaca que sobrepasan los rangos normales de UFC en ambas fincas, considerando que puede haber relación en deficiencia de higiene antes y después en la rutina de ordeño, mal manejo del lavado o desinfección de las máquinas o inadecuadas temperaturas de refrigeración en el transporte.

Según el Decreto 616 del 2006 donde presenta el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano nombra que la leche es considerada uno de los alimentos de mayor riesgo en salud pública, es así como tiene tanta reglamentación para llegar a tener una leche apta para el consumo humano.

Organizar los procedimientos para evitar errores en la preparación de los medios de cultivos, manipulación de bacterias, incluyendo desinfección de las áreas de los laboratorios para evitar y prevenir la contaminación de bacterias.

CONCLUSIONES

Las técnicas para identificar bacterias son primordiales y con frecuencia no se tienen en cuenta para realizar un control específico de cada bacteria realizando tratamientos sin identificación de éstas causando resistencia a antibióticos.

Se realizaron con éxito las pasantías aportando trabajo práctico y adquiriendo conocimientos desde otras áreas como microbiología poniendo en práctica lo aprendido durante la carrera.

Se pudo procesar y analizar las muestras de leche cruda por medio de las técnicas y máquinas pertenecientes al CNLM demostrando la importancia de éstas técnicas diagnósticas que ayudan a la prevención, control y tratamiento de la mastitis.

A pesar de tener una pasantía óptima, ocurrieron algunos inconvenientes, entre estos; la falta de materia prima como la sangre estéril de cordero para realizar agar base sangre, por lo cual era indispensable y nos llevó a realizar la toma de muestra de sangre humana entre compañeras y profesoras encargadas del laboratorio.

Algunas actividades estuvieron muy limitadas por el tiempo, dado que al contaminarse los montajes en cajas de petri con otras bacterias u hongos se debían descartar, esterilizar y reiniciar el trabajo.

RECOMENDACIONES

Continuar con más pasantías en modalidad de trabajo de grado dando la oportunidad a más estudiantes de realizarlas ya que permite obtener experiencia, conocimientos nuevos en investigaciones, proyectos y prácticas no solo en los laboratorios sino tener en cuenta las otras sedes de la Universidad como sede Usme donde se encuentran todos los animales propiamente de la carrera Medicina Veterinaria.

Se recomienda implementar y hacer uso frecuente de un control lechero para prevenir, tratar y controlar casos de mastitis en las fincas, ya que tiene alta prevalencia en el país.

El CNLM tiene un potencial enorme para explotar el conocimiento y capacidad de procesamiento de muestras de leche por esto se sugiere dar a conocer más los servicios podría ser por medio de las universidades como la UAN.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aldana A., Parra J. y Ramírez J., (2018), Análisis de técnicas de recuento de microorganismos.

https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/mente_joven/article/download/3665/3060

Bautista L.E., Stanchi N.O. (2007), Microbiología Veterinaria, Ed. Inter-médica.

Calderón R., Rodríguez R., & Vélez R. (2007). EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LECHE EN CUATRO PROCESADORAS DE QUESOS EN EL MUNICIPIO DE MONTERÍA, COLOMBIA. Revista MVZ Córdoba, 12(1), 912-920.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682007000100006

Carrascal A. et al., Ministerio de Salud y Protección Social, (2014), Perfil sanitario nacional de leche cruda para consumo humano directo.

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SNA/Perfil-sanitario-nacional-leche-cruda.pdf>

Centro de Escritura Javeriano. (2020). Normas APA, séptima edición. Pontificia Universidad Javeriana, seccional Cali. <https://www2.javerianacali.edu.co/centro-escritura/recursos/manualde-normas-apa-septima-edicion#gsc.tab=0%C2%A0>

<https://www2.javerianacali.edu.co/centro-escritura/recursos/manualde-normas-apa-septima-edicion#gsc.tab=0%C2%A0>

Cerquera J., Fernández F., Granja T., Peña J. y Trujillo E. 2012. Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. Revista Veterinaria REDVET 13(11).

https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infeciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf

Colom K., Ferrer C., Sánchez M., Capacidad Hemolítica (2021).

<https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice/identificacion-bacteriana/capacidad-hemolitica>.

Consejo Nacional de la Calidad de la Leche y prevención de la Mastitis (CNLM), (2023),

<https://redlacteacnlm.com>

Corbellini,(1996). La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche.Carlos N.

Corbellini, instituto nacional de tecnología agropecuaria proyecto lechero,E.E.A pergamino. <https://www.agro.uba.ar/sites/default/files/agronomia/la-mastitis-bovina-y-su-impacto-sobre-calidad-de-leche.pdf>

Dirección de Bromatología de Neuquen. Procedimientos de microbiología general (2021),

<https://www.saludneuquen.gob.ar/wp-content/uploads/2021/08/ANAL-005-Microbiologia-general.pdf>

Durán A, Oramas D. & Zhurbenko, R. (2004). Propuesta de una modificación en la formulación

del medio agar manitol salado utilizado en el aislamiento de estafilococos de importancia clínica. Revista Cubana de Medicina Tropical, 56(3), 172-177. Recuperado

en 28 de junio de 2023, de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602004000300004&lng=es&tlng=es.

LACTOSCAN COMBO Manual de Uso© (2017), Milkotronic” Ltd.

https://autocellcount.com/uploads/files/Lactoscan_COMBO_Esp.pdf

MCD LAB, (s.f), Ficha técnica Agar Nutritivo, MCD LAB Especialistas en medios de cultivo.

Ministerio de la Protección Social, (2006), Decreto 616 de 2006-Por el cual se expide el

Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo

humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendi, importe o

exporte en el país, [https://www.ica.gov.co/getattachment/15425e0f-81fb-4111-b215-](https://www.ica.gov.co/getattachment/15425e0f-81fb-4111-b215-63e61e9e9130/2006d616.aspx)

[63e61e9e9130/2006d616.aspx](https://www.ica.gov.co/getattachment/15425e0f-81fb-4111-b215-63e61e9e9130/2006d616.aspx)

Pastor. G (2006) Microbiología Clínica, Editorial Médica Panamericana S.A,

[https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=TdsoWPEYaoUC&oi=fnd&pg=PR15&dq=+microbiologia+&ots=9Prw5zZPvP&sig=Azae_DCHrWjGYdwxWyAU0q](https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=TdsoWPEYaoUC&oi=fnd&pg=PR15&dq=+microbiologia+&ots=9Prw5zZPvP&sig=Azae_DCHrWjGYdwxWyAU0qYqtk&redir_esc=y#v=onepage&q=agar%20sangre&f=false)

[Yqtk&redir_esc=y#v=onepage&q=agar%20sangre&f=false](https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=TdsoWPEYaoUC&oi=fnd&pg=PR15&dq=+microbiologia+&ots=9Prw5zZPvP&sig=Azae_DCHrWjGYdwxWyAU0qYqtk&redir_esc=y#v=onepage&q=agar%20sangre&f=false)

Ryan K.J., Ray C(Eds.), (2017). Sherris. Microbiología médica, 6e. Editorial McGraw Hill.

cap. 21, pág. 267.

[https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2169§ionid=16297](https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2169§ionid=162978735)

[8735](https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2169§ionid=162978735)

Universidad Antonio Nariño (UAN), (2013, 22 de abril), Identidad Institucional.

[https://www.uan.edu.co/component/k2/item/8-mision-](https://www.uan.edu.co/component/k2/item/8-mision-vision#:~:text=Formar%20personas%20altamente%20calificadas%20y,fundamentado)

[vision#:~:text=Formar%20personas%20altamente%20calificadas%20y,fundamentado](https://www.uan.edu.co/component/k2/item/8-mision-vision#:~:text=Formar%20personas%20altamente%20calificadas%20y,fundamentado)

[s%20en%20la%20incorporaci%C3%B3n%2C%20difusi%C3%B3n%2C](https://www.uan.edu.co/component/k2/item/8-mision-vision#:~:text=Formar%20personas%20altamente%20calificadas%20y,fundamentado)

Universidad Arturo Prat, (2021), Prueba de la coagulasa

[https://www.studocu.com/cl/document/universidad-arturo-prat/microbiologia-e-](https://www.studocu.com/cl/document/universidad-arturo-prat/microbiologia-e-immunologia-oral/prueba-de-la-coagulasa/40080245)

[immunologia-oral/prueba-de-la-coagulasa/40080245](https://www.studocu.com/cl/document/universidad-arturo-prat/microbiologia-e-immunologia-oral/prueba-de-la-coagulasa/40080245)

