



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Cátedra Componente de Investigación



**Determinación de *Staphylococcus aureus* resistente a la
meticilina en leche cruda bovina de la finca “HR” Sector
Caño Negro, Municipio Samuel Darío Maldonado del
Estado Táchira.**

Autora

Alexania Méndez.

Tutora

Judith Araque.

Mérida, octubre de 2014



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Cátedra Componente de Investigación



Determinación de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en leche cruda bovina de la finca “HR” Sector Caño Negro, Municipio Samuel Darío Maldonado del Estado Táchira.

Trabajo final de grado para optar al título de Licenciada de Bioanálisis.

Autora

Alexania Méndez.

Tutora

Judith Araque.

Mérida, octubre de 2014

RESUMEN

El presente trabajo se desarrollo con el fin de determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes en la leche cruda producida en la finca “HR” en el sector Caño Negro, Municipio Samuel Darío Maldonado del Estado Táchira. Se trabajaron con 10 muestras de leche cruda de 500 mL tomadas los primeros días del mes de febrero de 2014 y analizadas en el Laboratorio de Microbiología Aplicada de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Se analizó la Calidad Sanitaria, basada en la carga microbiológica, buscando la presencia de bacterias patógenas de la especie *Staphylococcus aureus* y determinar si son resistentes a la meticilina. Tras los análisis, se detectó la presencia de catorce cepas cocos Gram positivos, cinco de las cuales fueron *Staphylococcus aureus*. Encontrando de entre dicho genero resistencia meticilínica en tres de las cinco cepas identificadas.

Palabras Clave: *Staphylococcus aureus*, resistente a meticilina.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A Dios todopoderoso, por darme el ser y permitirme llegar a esta ilustre casa de estudios y cumplir tan maravillosa meta, por llenarme de paciencia y esperanza en este camino.

A mi Madre Sonia Avendaño, agradezco haberme dado la vida y guiarme por el sendero del bien, ser ejemplo de fortaleza y perseverancia, lucho cada día para ser motivo de orgullo para ti.

A mi Abuela Josefa Salas, por ser mi compañía mi apoyo incondicional una madre y mejor amiga, aunque no estés físicamente vives en mi corazón y sé que desde algún lugar estarás feliz por realizar este sueño compartido.

A Carlos Vanegas, por ser figura paterna por ser ejemplo de lucha y superación por el apoyo brindado gracias papá.

A mis Madrinas y Tíos, por su apoyo moral y sentimental.

A mi Esposo Yorman Castro, por su fiel compañía y apoyo en cada paso de este camino.

A mi hija Aleska Castro, por ser luz en mi vida mi gotita de agua dulce y mi felicidad.

A mis hermanas y Primos, por los buenos ratos picardías y alegrías.

A mis Amigos y demás familiares por el apoyo recibido en momentos buenos y malos.

A Elizabeth Sánchez, Josefa Rodríguez, Keyla Moreno, Lady Combita, Familia Sánchez Paredes, por su amistad, consejos, cariño y apoyo un Dios les pague.

A mi Tutora por ser guía en este proyecto por su tiempo y dedicación.

A mis profesores y compañeros de clase por compartir conocimientos y buenos momentos en este largo camino.

A todos en general un Dios les pague.

ÍNDICE

RESUMEN	2
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA	4
ÍNDICE	5
ÍNDICE DE ESQUEMAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE GRÁFICOS	9
ÍNDICE DE ANEXOS	10
I.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
	¡Error! Marcador no definido.
II.	Justificación
	15
III.	MARCO TEÓRICO
	16
3.1.	Características de la Leche Bovina
	17
3.2.	Constituyentes químicos de la leche de vaca
	18
3.3.	Bacteriología de la leche Bovina
	19
3.4.	Tipos de microorganismos presentes en la leche
	20
3.5.	Principales enfermedades producidas por microorganismos causantes de contaminación en la Leche
	21
3.6.	Generalidades de Staphylococcus aureus
	21
3.6.1.	Características Morfológicas y Microbiológicas de Staphylococcus aureus
	22
3.6.2.	Factores de virulencia de Staphylococcus aureus
	22
3.6.3.	Enfermedades causadas por Staphylococcus aureus
	23
3.7.	Resistencia de Staphylococcus aureus a los antimicrobianos
	23
3.8.	Modelo de Cultivo Bacteriológico
	23
IV.	EL PROBLEMA
	24

4.1.	Antecedentes de Trabajos Previos	25
4.2.	Antecedentes Históricos	30
V.	Hipótesis	32
VI.	Objetivos de la Investigación	33
6.1.	Objetivo General	34
6.2.	Objetivos Específicos	34
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	
	¡Error! Marcador no definido.	
7.1.	MATERIALES	35
7.1.1.	Material biológico	35
7.1.2.	Muestras	35
7.1.3.	Medios de cultivo	35
7.1.4.	Reactivos	35
7.2.	METODOLOGÍA	35
7.2.3.	Aislamiento	36
7.3.	Prueba de sensibilidad a antibióticos.	¡Error! Marcador no definido.
VIII.	RESULTADOS	40
IX.	DISCUSIÓN	43
X	CONCLUSIÓN	46
I.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
	ANEXOS	51

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. - <i>Procedimiento para el tratamiento de la muestra.</i>	36
Esquema 2. - <i>Agar Braid-Parker para determinación de S. aureus. Incubar a 37°C por 24-48 horas.</i>	36
Esquema 3. - <i>Aislamiento e identificación de Staphylococcus aureus.</i>	37
Esquema 4. - <i>Flujograma de trabajo</i>	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- <i>Distribución porcentual cepas puras e impuras</i>	41
Tabla 2.- <i>Distribución porcentual de la resistencia a la metilina</i>	42

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 1.- <i>Distribución porcentual cepas puras e impuras</i>	41
Gráfica 2.- <i>Distribución porcentual de la resistencia a la meticilina</i>	42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.- <i>Interpretación del método Kirby-Bauer</i>	52
Anexo 2.- <i>Controles método Kirby-Bauer</i>	54

INTRODUCCIÓN

El Staphylococcus aureus; bacteria causal de la mastitis bovina, ha sido aislado de otros sitios del cuerpo de vacas y en el entorno de granja de productos lácteos, la glándula mamaria lactante. (Hata y col., 2010). El hecho de que *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) lo convierte en un patógeno de importancia en hospitales, la comunidad, y la ganadería. Las personas que laboran con el ganado están en riesgo de ser portadores de *S. aureus* resistente a meticilina (Huber y col., 2009).

Es de gran importancia realizar esfuerzos en el campo de la salud pública y es necesario establecer un sistema de monitoreo para el adecuado análisis de esta tendencia, para mantener una situación en donde la prevalencia de SARM sea baja, y se mantenga limitado el riesgo de transmisión entre animales y contaminación de alimentos de origen animal (Huber y col., 2009). La prevalencia en presencia de *S. aureus* ha variado en el transcurso de los años a en todo el mundo.

El propósito de esta investigación será determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes en la leche cruda producida en la finca “HR” en el sector Caño Negro, Municipio Samuel Darío Maldonado del Estado Táchira en el periodo de 2012-2014, esto permitirá tener una mejor percepción de la situación epidemiológica del ganado vacuno, para así actuar adecuadamente en la prevención, seguimiento e implementación de políticas sanitarias en cuanto a los problemas de resistencia bacteriana ante los antibióticos de uso veterinario.

Esperamos que con los resultados obtenidos en este trabajo permitan tener mejor control y seguimiento del uso de antibióticos a nivel veterinario y evitar que se sigan produciendo cepas resistentes a los antibióticos.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leche constituye uno de los alimentos indispensables en una dieta balanceada, sin embargo, puede ser un vehículo para transmitir una diversidad de enfermedades infecciosas entre el hombre y animales. La leche es el producto de secreción mamaria natural, obtenido mediante ordeño de la vaca. Como tal, contiene proteínas, carbohidratos, grasas, sales minerales y agua; por lo tanto, es un excelente medio de cultivo natural para los microorganismos, cuya determinación tiene importancia, entre otras cosas, para conocer las condiciones en la cual fue obtenida la leche (Barrios, 1988).

En algunos casos, la leche puede contaminarse con microorganismos patógenos, procedentes del animal, del ordeñador, utensilios, etc. El hombre al ingerir la leche contaminada puede contraer enfermedades como brucelosis, salmonelosis, etc. Por otra parte, dichos microorganismos metabolizan los componentes de la leche causando modificaciones en su sabor, color y aspecto (Barrios, 1988). Tal como se dijo anteriormente la leche es un vehículo para transmitir infecciones causadas por diferentes microorganismos, entre ellos *Staphylococcus aureus*, el cual, ha sido considerado clásicamente un patógeno nosocomial.

Sin embargo, también está presente en muchos centros de larga estancia, y en los últimos años ha aumentado su importancia como patógeno comunitario (Sopena y col., 2002).

La Dra. Giacoboni G. (2013) publica en Argentina, resistencia a los antimicrobianos en medicina veterinaria y su relación con la salud pública donde refiere que hasta el año 2006 fue sensible a los antibióticos β lactámicos, y en ese año emergió como resistente en medicina veterinaria. De igual manera que *S. aureus* resiste a la meticilina lo hace *S. pseudointermedius*, mediante el gen *mec A*. Este gen se localiza dentro del cromosoma de la bacteria en un elemento genético móvil llamado "Staphylococcal chromosomal cassette" (SCC*mec*). Este elemento se puede transferir entre las diferentes especies de *Staphylococcus* tanto coagulasa positivos como coagulasa negativos.

Cantón R, Ruiz-Garbajosa P (2013) en su publicación Infecciones causadas por bacterias Gram positivas multirresistentes que el SARM y enterococo multirresistente son un problema en la infección nosocomial y han surgido nuevos retos en su control. SARM ha aumentado su perfil multirresistente; se han descrito aislados resistentes a vancomicina y linezolid, y con menor sensibilidad a daptomicina. Asimismo, han surgido nuevos clones (ST398), inicialmente asociados a explotaciones ganaderas de cerdos, y variantes mec (mecC) con origen en animales de granja que escapan a la detección en sistemas moleculares basados en el gen mecA. En enterococo, se han descrito aislados con resistencia al linezolid y menor sensibilidad a daptomicina, y se ha comunicado en Europa el aislamiento de *Enterococcus faecium* resistente a ampicilina por producción de β -lactamasa. El control de SARM y enterococo multirresistente debe combinar una mejor utilización de los antimicrobianos y medidas epidemiológicas, incluyendo la detección de portadores, que reduzca la presión de colonización y, por tanto, su transmisión.

Los estudios realizados en los últimos 10 años, han reportado a través de diferentes autores, una prevalencia variada de *Staphylococcus aureus* asociada a infecciones graves tanto en animales como en el humano. Al respecto, la frecuencia relativa ha variado entre 0,18% y 46,6% (Huber y col., 2011; Rivera y col., 2011; Hata y col., 2010; Huber y col., 2009; Know, 2005; Lee, 2003; Zadoks y col., 2002; Akineden, 2001; Allen y col., 1994). En Europa, específicamente en Suiza se han encontrado prevalencias de 46,4% (Huber y col., 2011) y 1,4% (Huber y col., 2009), en 8 granjas de 7 lugares diferentes de una región de Alemania se realizó el estudio de 60 muestras de leche con mastitis de 60 vacas, donde se aislaron 103 cepas de *Staphylococcus aureus* (Akineden y col., 2001), la frecuencia relativa en Inglaterra está cercana a 41,42% (Allen y col., 1994). Mientras que en Holanda se encontraron cifras de frecuencia relativa cercanas a 19,11% (Zadoks y col., 2002), y en España de 2,6% (Gil, 2000)

La prevalencia en el continente asiático es muy baja, reportándose en Corea frecuencias relativas de 0,18% (Know y col., 2005) y 6,6% (Lee, 2003), mientras en

Japón 1,1% de prevalencia (Hata y col., 2009). En otro estudio realizado en Japón se reportó una prevalencia de 15 a 20%. Mientras que en EE.UU. La prevalencia fue de 7,8% (Gil, 2000). En Suramérica específicamente en Venezuela, se estudió la presencia *Staphylococcus aureus* en diferentes muestras lácteas, así como también, su susceptibilidad a determinados antibióticos, la frecuencia relativa encontrada en este estudio respecto al *Staphylococcus aureus* fue de 20% (Rivera y col., 2011).

Considerando los antecedentes del problema referido, se puede formular la siguiente interrogante:

¿Existirá la presencia de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (SARM) en la leche cruda de ganado bovino en la finca “HR” Sector Caño Negro, Municipio Samuel Darío Maldonado del Estado Táchira?

II. Justificación

Es importante el estudio de la resistencia microbiana a los antibióticos en la leche cruda en la finca “HR” del sector Caño Negro, para determinar la prevalencia de este problema que repercute no solo en la leche cruda como tal sino también en los productos secundarios de esta y en los consumidores tanto en lo que refiere al control sanitario sino también al económico.

Los análisis microbiológicos de las muestras de leche eran necesarios para determinar el tipo, la carga bacteriana y aislar la especie *Staphylococcus aureus* de interés en el estudio por presentar una prevalencia en adquirir resistencia meticilínica.

Además, la determinación de la resistencia a la meticilina por el *Staphylococcus aureus* en leche cruda puede servir de base de datos para futuros proyectos de antibiogramas. El conocimiento de estos datos también alertará a la población y a los dirigentes de la comunidad de la situación de la resistencia a antibióticos administrados al ganado. Logrando así plantear programas y sistemas más adecuados y efectivos en prevenir no solo infección de todo el proceso de producción sino también evitar que los microorganismos adquieran resistencia antibiótica.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. *Características de la Leche Bovina*

La leche es el líquido segregado por las glándulas mamarias, pudiendo variar su composición entre diferentes especies vacunas; es un líquido de composición compleja, de color blanquecino y opaco, con un pH cercano al neutro y de sabor dulce, cuyo propósito natural es la alimentación de la cría durante sus primeros meses de vida. En cuanto al ordeño se toman diversos factores como raza, intervalo de ordeño, cuartos de la ubre, estaciones climáticas, alimentación, enfermedades, temperatura ambiental, edad entre otros (Botero y col., 2012, Magariños, 2001). Es considerada como el producto más noble de los alimentos, dada su composición peculiar rica en proteínas, grasas, carbohidratos, sales minerales y vitaminas; constituye un alimento esencial para el hombre y para todas las especies de mamíferos y las restricciones a su uso son limitadas a casos excepcionales (Spreer, 1991, Agudelo y col., 2005; Kirk y col., 2005). En trazas de minerales como cobre, zinc, manganeso y hierro (Enb y col., 2009).

La leche para consumo humano a de cumplir con ciertas características físicas, microbiológicas e higiénicas establecidas. Estas características pueden ser la densidad, el índice crioscópico, el índice de refracción, la acidez titulable, la materia grasa, los sólidos no grasos, el número de leucocitos, los microorganismos patógenos, la presencia de sustancias inhibidoras, etc. Las características más importantes de la leche son su variabilidad, alterabilidad y complejidad (Magariños, 2000, Barrios de Moreno A 1995).

De acuerdo a la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) la leche cruda bovina sería el producto integro, normal y fresco obtenido del ordeño higiénico e interrumpido de vacas sanas (COVENIN 903-93). La cual debe cumplir con los siguientes requisitos:

1. Se denomina “leche fría” a la leche cruda que inmediatamente después de su ordeño sea refrigerado a una temperatura inferior a 5°C y mantenida a una

temperatura no mayor a 10°C durante su almacenamiento y transporte, se considera leche caliente aquella que no ha sido refrigerada inmediatamente después de su ordeño.

2. La leche cruda debe ser limpia, libre de calostro y de material o sustancias ajenas a su naturaleza tales como: conservadores y colorantes.
3. La leche cruda debe presentar olor, calor, sabor y aspecto característica del producto
4. Microbiológicamente de acuerdo al recuento total en placas determinado según la norma, la leche cruda se clasifica en:

Categoría A Hasta 500.000 UFC/mL

Categoría B Desde 500001 hasta 1500000 UFC/mL

Categoría C Desde 1500001 hasta 5000000 UFC/mL

Sin clasificación más de 5000000 UFC/mL

5. Para efectos de compra y venta de la leche cruda se podría utilizar el tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM) según Norma Venezolana COVENIN 939 de acuerdo a lo siguiente :

Clase I Leche fría con más de 4 horas de TRAM

Clase II. Leche fría con 2 a 4 horas de TRAM

Clase III. Leche caliente con 30 min., a 2 horas de TRAM.

3.2. *Constituyentes químicos de la leche de vaca*

La leche es el único material producido por la naturaleza para funcionar exclusivamente como alimento, ya que, constituye una fuente nutritiva, no superada por ninguna otra conocida por el ser humano. La confirmación de esta imagen nutritiva está en el uso extensivo que tiene la leche y sus derivados, como parte de la dieta diaria en los países desarrollados, a consecuencia de esto, estas sociedades gozan casi de una completa carencia de enfermedades nutricionales en la población

infantil y adultos jóvenes. En contraste, una elevada proporción de los bebés y niños en los países en desarrollo, donde el suministro de leche es mínimo o nulo, sufren deficiencias nutricionales (Jay, 1994).

Los numerosos componentes de la leche le atribuyen el alto valor nutricional, las proteínas son de alto valor biológico, su grasa muy digestible rica en calcio, y fósforo, además aporta notables cantidades de vitaminas; la proteína láctea tiene un gran interés para la industria procesadora de queso, además de contener un gran número de aminoácidos esenciales para el hombre (Brinez y col., 2008).

3.3. *Bacteriología de la leche Bovina*

La microbiología está estrechamente relacionada con todos los sectores de la industria lechera. Los principios microbiológicos son la base de las técnicas de producción higiénica de la leche, dirigen muchos de los tratamientos para su transformación industrial y son el fundamento de los métodos de conservación de los productos lácteos. La calidad de la leche y sus productos lácteos dependen en gran parte de su microbiología y en su valoración oficial se incluyen siempre normas microbiológicas (Amiot, 1991).

Se ha señalado que la leche presente en las células de la ubre de animales sanos es estéril (Toalle, 1980), pero que posteriormente al salir de este órgano, comienza a ser colonizada por diversos tipos de microorganismos provenientes de una gran variedad de fuentes, que incluyen la parte externa de la ubre, superficie de los pezones, manos de los ordeñadores, equipos de ordeño mecánico, utensilios empleados, agua utilizada, alimentos y tipo de alimentación suministrada, equipos de almacenamiento, así como del medio ambiente donde se encuentra (Coorevits y col., 2008; Lejeune y Rajala-Schultz, 2009; Vacheyrou y col., 2011, Administración de Drogas y Alimentos de los EE.UU. 2006). Generalmente se contamina de manera accidental, porque no se cumplan los requisitos sanitarios o en el proceso de manipulación (Barrios, 1988). Por lo que hay múltiples factores predisponentes a infección del ganado y por consiguiente de la leche. Por lo que hay que controlar puntos críticos en el ordeño a nivel industrial: a) Equipo de ordeño, b) Rutina de ordeño c) Manejo de

animales d) Medidas de higiene e) Desinfección de pezones post-ordeño e) Condición del pezón f) Tratamiento de los casos de mastitis clínica g) Terapia al secado h) Descarte de vacas con mastitis crónica h) Chequeo de animales comprados i) Parición. (Blanco O, Miguel Á 2013, Actualidad Ganadera 2014, Ellner Richard 2000)

Tal como se dijo anteriormente, la leche tiene gran importancia en la transmisión de algunas enfermedades. Puede contener microorganismos patógenos de origen animal, por enfermedad del mismo o por contaminación con heces, orina u otra secreciones. Entre las enfermedades del ganado que pueden transmitirse al hombre tienen particular importancia la brucelosis, tuberculosis (Ellner Richard 2000, Barrios, 1988).

El hombre también puede contaminar la leche a partir de diversas fuentes. El portador puede depositar los microorganismos presentes en sus manos o secreciones faríngeas, en la leche. Las enfermedades de origen humano transmitidas por la leche comprenden la fiebre tifoidea, disentería bacilar, intoxicaciones alimentarias y hepatitis infecciosa ((Actualidad Ganadera 2014, Barrios, 1988).

3.4. Tipos de microorganismos presentes en la leche

La leche cruda de origen bovino posee el potencial para soportar y contener una diversa población de microorganismos, la cual en base a diversos estudios realizados, se ha observado está dominada por la presencia de una microbiota bacteriana abundante y biodiversa (Raats y col., 2011; Quigley y col., 2011; Vacheyrou y col., 2011).

Dentro de la microbiota bacteriana observada en la leche cruda de origen bovino destacan los géneros bacterianos *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Aerococcus*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Brucella*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Coxiella*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Rothia*, *Salmonella*, *Serratia*,

Sphingomonas, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Weissella*, entre otros (Verdier Metz y col., 2009; Raats y col., 2011; Quigley y col., 2011; Vacheyrou y col., 2011; Mallet y col., 2012; Masoud y col., 2012; Quigley y col., 2013).

3.5. Principales enfermedades producidas por microorganismos causantes de contaminación en la Leche

Las enfermedades transmitidas por la leche cruda contaminada, la mayoría de las cuales son de origen bacteriano, constituyen un problema de salud pública a nivel mundial. Los microorganismos indicadores que generalmente se cuantifican para determinar la calidad sanitaria de la leche son bacterias heterótrofas mesófilas e incluyen los grupos de bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, coliformes fecales y enterococos, así como especies bacterianas tales como *Aeromonas hydrophilas*, *Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus* (Fuentes y col., 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha desarrollado una lista de patógenos que transmitidos por la leche pueden originar enfermedades en el hombre, entre estos se destacan: *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Coxiella burnetti*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella aerogenes*, *Escherichia coli*, entre otras (Mangariños, 2000).

La lucha contra los microorganismos patógenos, causantes de enfermedades transmitidas por la leche cruda, requiere de procedimientos adecuados de inspección sanitaria, lo que lleva al desarrollo de métodos cada vez mas rápidos y efectivos para la detección e identificación de bacterias nocivas para el ser humano; siendo estas una amenaza a la salud pública y son una causa importante de morbilidad en los países en desarrollo, aunque la mayoría son leves y se asocian a síntomas gastrointestinales

agudos tales como diarreas y vómitos, en algunas ocasiones es mucho más severa y peligrosa para la vida, especialmente en niños y ancianos (Roja y col., 2006).

3.6. Generalidades de *Staphylococcus aureus*

3.6.1. Características Morfológicas y Microbiológicas de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, es un coco Gram positivo, de 0,5-1,5 µm de diámetro, catalasa positivos, que se encuentran microscópicamente aislados, en pares, tétradas o formando racimos irregulares. Son inmóviles, facultativamente anaerobios, no formadores de esporas, generalmente no capsulados, es un reconocido patógeno humano, siendo agente etiológico de un amplio espectro de infecciones de origen comunitario y nosocomial (Murray y col., 1995 Pahissa, Albert 2009, Ellner Richard 2000).

El peligro de la contaminación de la leche con este microorganismo, reside en que esta bacteria puede producir una enterotoxina capaz de causar en el hombre gastroenteritis agudas. Esta enterotoxina es termoestable y los estafilococos que la producen se encuentran con mucha frecuencia en operarios aparentemente sanos y en el ganado lechero. *Staphylococcus aureus* no es termorresistente, por lo tanto las combinaciones de tiempo y temperatura utilizados en la pasteurización destruyen la mayor parte de las especies de *Micrococcus*. Pero aun, destruyendo los *Micrococcus*, la enterotoxina conserva potencia suficiente para producir gastroenteritis y otros trastornos en las personas (Mangariños, 2000).

3.6.2. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

Función	Factores de virulencia
<i>Involucrados en la adherencia a las células del huésped</i>	Componentes microbianos de superficies que se adhieren a moléculas tisulares Proteína A
<i>Involucrados en la evasión de las defensas del huésped</i>	Polisacáridos capsulares Proteína A Biofilm α hemolisina Leucocidina Panton valentin
<i>Involucrados en la persistencia de la infección</i>	Variantes de colonias pequeñas Biofilm
<i>Involucrados en invasión tisular</i>	Proteasas, nucleasas, lipasas, hialuronidasas, fosfolipasa C, elastasa

Fuente Prescott y col., 1999, Gil, 2000.

3.6.3. Enfermedades causadas por *Staphylococcus aureus*

Produce una amplia gama de enfermedades, desde infecciones cutáneas superficiales a infecciones de partes blandas y ósteo-articulares como abscesos profundos, celulitis, infección de heridas quirúrgicas, osteomielitis, de las cuales es el agente más frecuentemente aislado, pudiendo estas infecciones alcanzar situaciones de gravedad extrema con riesgo de vida. Es también agente de sepsis, neumonías, endocarditis e infecciones del sistema nervioso central. Algunas cepas causan enfermedades mediadas por toxinas, como toxi-infecciones alimentarias, síndrome del shock tóxico y síndromes escarlatiniiformes (Galiana, 2003)

3.7. Resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antimicrobianos

Se han descrito tres mecanismos que explican la resistencia de *Staphylococcus aureus* a β -lactámicos: hiperproducción de β -lactamasa, modificación de las PBPs y resistencia intrínseca a meticilina. Hiperproducción de β -lactamasa o resistencia borderline, estas cepas producen altas cantidades de enzima, lo que hace que oxacilina y meticilina, que fueron desarrolladas para resistir la acción hidrolítica de la penicilinas, sean lenta aunque apreciablemente degradadas. Modificación de PBPS,

corresponde a una modificación mínima de las PBPs 1,2 y 4 de peso molecular normal pero con baja afinidad por antibióticos β -lactámicos. Resistencia intrínseca a meticilina, este tipo de resistencia se debe a la incorporación en el ADN bacteriano de un gen, el *mecA*. Este gen es un trozo de ADN cromosomal adicional de 30 a 50 Kb, que posee dos elementos regulatorios (*mecR1* y *mecI*) que controlan la transcripción del gen *mecA*. Pero además estos estafilococos poseen factores de virulencia, entre ellos una leucocidina que aparentemente destruye los neutrófilos (denominada de Pantón Valentine) (Gil, 2000).

3.8. Modelo de Cultivo Bacteriológico

Los principales defensores del uso de cultivos puros fueron dos grandes micólogos: A. de Bary y O. Brefeld. Anteriormente, se consideraba el término pleomorfismo (doctrina de las formas múltiples) como posibilidad de la variación morfológica. Es decir, en un mismo cultivo podían crecer diferentes tipos de microorganismos. Para tener una idea clara de la función y forma de los microorganismos, se debía evitar el estudio de poblaciones microbianas mixtas (Stainer y col., 1996).

Partiendo de los estudios realizados por Bary y Brefeld. Koch concibió la idea de crear un medio sólido, transparente, el fin fue ver el crecimiento de colonias, con previa modificación de la composición, para así cumplir con los requerimientos nutricionales de los microorganismos. El compuesto que cumplía con estas condiciones y el cual decidió usar Koch fue la gelatina. De allí parten muchas derivaciones de medios de cultivos (Stainer y col., 1996).

IV. EL PROBLEMA

4.1. Antecedentes de Trabajos Previos

En cuanto a la presencia de bacterias patógenas en la leche cruda bovina almacenada en tanques de enfriamiento, Ruusune y col. (2013), realizaron una investigación determinando la prevalencia de las mismas en leche cruda en Finlandia, observando la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulasa positiva*, *Yersinia enterocolitica* y *Bacillus cereus*. Por otra parte, la calidad higiénica se estudio mediante contenido de recuento total de bacterias heterótrofas aeróbicas mesófilas, concluyendo que en su totalidad en todas las muestras analizadas se obtuvieron presencia de patógenos, lo que sugiere que están presentes a pesar de aplicar excelentes condiciones higiénico-sanitarias. La concentración de bacterias patógenas en leche cruda fresca fue menor a la concentración de patógenos en leche refrigerada, por lo que algunas bacterias patógenas pueden multiplicarse a temperatura de refrigeración, por lo tanto concluyen estos investigadores que el consumo de leche cruda y productos de ésta, representa un riesgo potencial para la salud de la población.

En una investigación realizada por Signorini y col. (2012), utilizaron microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico sanitarias en la producción primaria de leche, estos investigadores advierten sobre la manipulación inadecuada de la materia prima, la presencia de peligros para el consumo o deficiencias en los procesos destinados a saneamientos, estos marcadores son herramientas importantes para poder desarrollar registros microbiológicos históricos a partir de los cuales se pueden establecer factores de referencia, los que permitirán implementar sistemas que garanticen la inocuidad alimentaría, utilizaron como marcadores microorganismo psicotrópicos, mesófilos, termodúricos, mohos, levaduras y *Staphylococcus aureus*, así como *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*. La información de cada uno de los marcadores permitió evaluar las condiciones

higiénicas sanitarias en la producción primaria de leche y generar registros que serán de utilidad para implementar el sistema de HACCP.

Vendier-Metz y col. (2012), analizaron la influencia de la biodiversidad bacteriana presente en la piel del pezón de la vaca y su influencia en la preparación de queso madurado a través de métodos moleculares, este estudio pone en relevancia la gran diversidad bacteriana heterotrófica mesófila que puede encontrarse en la piel del pezón, donde el 79,8% de las cepas aisladas corresponden a especies no identificadas y el resto a especies identificadas comúnmente encontradas en leche entre estas: *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Enterobacter*, *Aerococcus* y *Staphylococcus*. Estos microorganismos pueden contribuir al desarrollo de las características sensoriales del queso durante la maduración, y por otra parte indican que el pezón del animal puede distinguirse como una fuente interesante de estudio de biodiversidad en leche.

Resultados de estudios muestran que la aparición de agentes patógenos tales como las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* y *Salmonella enterica*; en leche cruda, es un problema común en las fincas productoras de leche, por lo que el control en la pasteurización antes del consumo sigue siendo primordial (Hill y col., 2012).

Según las investigaciones adelantadas por Sim Kheng y col. (2012), la variación de la población de bacterias heterótrofas en la leche cruda bovina puede estar asociada a las diferentes prácticas de producción y de ordeño aplicado en cada finca lechera. Estos estudios revelaron que la higiene personal de los manipuladores, así como la higiene en los utensilios empleados durante el proceso de ordeño, contribuyen a la diversidad de la población de bacterias heterótrofas.

En la revista BMC Veterinary research, Huber y col (2011), realizaron un estudio titulado: Predominio y características de *S. aureus* metilino-resistente coagulasa-negativo (MR-CNS) de ganado cadáveres de pollo, leche de tanque y bulto, carne picada, y personas en contacto. El objetivo del estudio fue evaluar la prevalencia de la MR-CNS, para identificar los estafilococos detectados a nivel de especie, y para evaluar los perfiles de resistencia a los antibióticos aislados en cepas de MR-CNS. El

estudio se realizó a 414 cepas, utilizando una matriz de desorción por láser o técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas. (MALDI-TOF MS). Después del enriquecimiento de dos pasos y el crecimiento en agar cromogénico, MR-CNS se detectaron en el 48,2% de las muestras de cadáveres de ganado y pollo, casos confirmados en leche de tanque y carne picada 46,4%. El 49,3% de las muestras humanas. Para la identificación de especies de la RM-CNS aislados de diferentes orígenes, MALDI-TOF MS resulto ser una herramienta rápida y fiable, y es adecuado para la detección de cantidades de muestras grandes.

Rivera y col (2011), realizaron una investigación titulada: *Staphylococcus aureus* procedentes de quesos: susceptibilidad a antibióticos y su relación con plásmidos. El objetivo general del estudio fue evaluar la susceptibilidad a antibióticos y la localización de los marcadores moleculares de resistencia en ADN plasmídico en cepas de *S. aureus* aisladas de quesos comercializados en el Estado Zulia-Venezuela. En los ensayos se detectaron cepas de *S. aureus* multirresistentes, caracterizándose SARM por su capacidad de crecimiento en placas hipersalinas suplementadas con oxacilina, y se evidencio su capacidad de producir β -lactamasas. Las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas portaban bandas plasmídicas cuyos tamaños oscilaron entre 2,30 - 34,537 kpb, siendo común cepas que llevaban consigo entre 1 a 4 bandas plasmídicas. Este trabajo tiene relación con el estudio, ya que los autores encontraron *S. aureus* como causa de infección tanto en animales como en el humano.

En la revista Journal of Clinical Microbiology, Hata y col (2010), realizaron una investigación titulada: Diferencias genéticas de SARM entre cepas aisladas de bovinos y personas. El objetivo fue realizar un análisis genético de *S. aureus* presente en la especie bovina y compararlo con cepas humanas. Para esta investigación la metodología utilizada fue electroforesis en gel de campo pulsado, secuencia de multilocus (MLST), PCR-polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción y el método de coagulasa serotipificación. Aunque en los resultados de MLST los linajes de un tipo de secuencia 97 ST97 y ST705 parecen estar alejadas entre sí por el

análisis filogenético, ambos tenían características comunes, es decir, *IukM* / *IukE* PV-VI y coagulasa serotipo.

En muestras de leche cruda bovina analizadas por Kuang y col. (2009), en Hokkaido, Japón, estos autores logran identificar bacterias heterótrofas mesófilas como las especies *Klebsiella oxytoca*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; que representan la ecología microbiana y biodiversidad de la leche proveniente de bovinos de esa zona. Los autores realzan la limitación de las técnicas tradicionales de identificación y propone la caracterización de la microbiota bacteriana por técnicas moleculares de identificación como herramienta potencial para la industria láctea.

Huber y col. (2009), en su trabajo titulado: Predominio y características de SARM en personas en contacto con animales de granja, en ganadería, y en alimento de origen de animal, Suiza. El objetivo general fue analizar la presencia de SARM. Se incluyeron en el estudio 20 muestras (4 veterinarios, 10 cerdos, 3 becerros, un novillo y 2 muestras de leche mastitis) que dieron positivo para SARM. Las 20 cepas de SARM fueron sometidas a pruebas de susceptibilidad a los antibióticos y de electroforesis de campo pulsado en gel con uso de la enzima de restricción *Eag* I. Encontraron que de 142 muestras de leche con mastitis, dos dieron positivo para SARM expresando una frecuencia relativa de 1,4%.

Palma y col. (2007) realizaron estudios al sur del Estado Aragua, en leche cruda de origen bovino, donde obtuvieron como resultado que no existe una buena práctica de ordeño o manejo de ordeño en las fincas estudiadas, presentando en las muestras analizadas más del 60% bacterias heterótrofas tales como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y diversas especies de *Pseudomonas*.

Calderón y col. (2006), por su parte, analizaron muestras de leche cruda en diferentes regiones de Colombia, resultando que durante las épocas de calor las leches fueron asociadas a una menor calidad bacteriológica. Consideran estos autores que en las zonas frías las bajas temperaturas ambientales retardan el crecimiento bacteriano, sin

embargo, un alto contaje de aeróbico mesófilos se encontraron también en las zonas con máximas precipitaciones fluviales, relacionando esto con las malas condiciones higiénicas de los establos, de los sitios de ordeño y de los operarios, así como la calidad bacteriológica del agua usada para la limpieza y desinfección de los pezones.

Kwon y col. (2005), en la revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, publicaron un estudio titulado: *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant Staphylococcus aureus and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea*. El objetivo general fue identificar los SCCmec SARM aisladas de leche bovina, y examinar la relación genética entre *S. aureus* metilino resistente (SARM) a partir de leche bovina y SARM de muestras humanas. Metodología: se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, PCR y análisis de secuenciación para determinar SCCmec tipo SARM, multilocus de secuencia mecanográfica (MLST). Encontraron 14 *Staphylococcus aureus* metilino resistente (SARM) y un solo SCCmec en muestras de leche bovina, y el análisis de MLST demostró que no tenían ninguna relación genética con el CA-SARM, que ha causado infección en humanos en Corea. La investigación realizada por dichos autores, aporta datos importantes para el estudio, ya que tales investigadores también encontraron al mismo patógeno como causante de infección en la leche bovina y al mismo tiempo la compararon con la aparición de CA-SARM en la infección humana.

Lee (2003), en la revista *Applied and Environmental Microbiology*, publicaron una investigación titulada: *SARM en cepas aisladas de animales, alimentos y su transmisión potencial a gente*. El objetivo del estudio fue determinar la relación epidemiológica molecular de los aislamientos de SARM de 15 animales aislados con seres humanos. El método usado para la investigación fue amplificado al azar de ADN polimórfico, así como también se realizaron tinción de Gram., prueba de coagulasa, actividades de la ureasa, y un sistema Staph Ident. De las 1913 muestras animales iniciales, *S. aureus*, de los cuales 28 son SARM (prevalencia 6,6%), de las 28 muestras 15 fueron positivas por PCR para el *mec A* gen. De estas 15 muestras, 12

eran de vacas lecheras y 3 de los pollos. Aunque el autor investigo la presencia de SARM en pollos, la prevalencia mayor se encontró en las vacas lecheras.

Zadoks y col. (2002), realizaron una investigación titulada: comparación de *S. aureus* aislado de piel bovina y humana. El objetivo del estudio fue comparar las cepas obtenidas para evaluar el papel de los equipos de ordeño y la piel como fuentes de *S. aureus* en mastitis. *Staphylococcus aureus* aislados de la piel de los pezones de la especie bovina, la piel humana, el equipo de ordeño, la leche de vaca y por medio de electroforesis en gel de campo pulsado, se tomaron las huellas digitales. *S. aureus* cepas de la piel y de la leche puede ser transmitido a través tanto de la máquina de ordeño, pero que las cepas de piel no son fuente importante de la presencia de *S. aureus* intramamario en las infecciones de las vacas lecheras.

Un estudio publicado en el año 2001 por Akineden y col, en la revista Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, titulada: Toxinas generales y otras características de *S. aureus* aislados de la leche de vacas con mastitis. Tuvo como objetivo general comparar fenotipo y genotipo de 60 muestras de leches de 60 vacas con mastitis de 8 diferentes granjas de Alemania, así como la identificación de varias toxinas. Para analizar las relaciones epidemiológicas, los aislamientos fueron sometidos a toma de huellas dactilares de ADN por macrorrestricción análisis de su ADN cromosómico. 103 cepas aisladas de muestras de leche de 60 vacas con mastitis y con presencia de *Staphylococcus aureus* fueron analizadas concluyendo que un número mínimo de clones parecía ser responsable de los casos de mastitis bovina en los distintos parques.

Allen y col. (1994), en su trabajo titulado: Comparación de tres medios semiselectivos para el aislamiento de SARM. El propósito del estudio fue comparar la facilidad de identificación y aislamiento de SARM en la leche a la meticilina agar con el agar-sangre a la meticilina y medio de Chapman con el añadido a la meticilina. En la metodología se utilizaron los agares anteriormente nombrados como son: agar leche meticilina, agar Chapman y agar sangre a la meticilina. Los resultados obtenidos en la meticilina leche agar fue colonias de SARM que varían de color

crema a naranja, la intensidad del color se profundiza a medida que la incubación es prolongada. SARM aislados en el medio Chapman producen colonias amarillentas por el uso del manitol. En el agar sangre a la meticilina la pigmentación de las colonias de SARM varía entre tensiones e incluso dentro de la misma cepa. Esta investigación tiene relación con el trabajo desde el punto de vista metodológico, en cuanto a las técnicas de diagnóstico y sistema de variables.

4.2. Antecedentes Históricos

La microbiología es la ciencia encargada del estudio de los microorganismos, (de Mikros “pequeños”, bios “vida”, y logos “estudio”). Es la rama de la biología dedicada a estudiar los organismos que solo son visibles a través del microscopio, entre ellos los procariotas y eucariotas. La bacteriología tradicional se ha dedicado especialmente a los microorganismos patógenos entre ellas, bacterias, virus y hongos, dejando a otros microorganismos en manos de la parasitología y otras categorías de la biología (Tortora. Funke y case 2007, Murray y col., 2002).

El término bacteria fue introducido hasta el año 1828 por Christian Gottfried Enrenberg. En 1676 Anton Van Leeuwenhoek, fue el primero en realizar una observación microbiológica. Examinó con sus lentes de microscopio una gota de agua y descubrió un mundo formado por millones de diminutos “animáculos” (Murray y col., 2002).

En la década del 50 con la introducción de la penicilina y sulfonamidas, los estreptococos fueron desplazados por los estafilococos como agentes principales de infección intrahospitalaria. Así, en 1941, las infecciones estafilocócicas eran erradicadas con penicilina, pero poco después de su introducción, Spink reporto el aislamiento de una cepa resistente por producción de β -lactamasas. En 1959 apareció la meticilina, una penicilina semisintética, como antimicrobiano de elección para cepas de *Staphylococcus aureus*, y en 1961 Jevons, en Londres, hizo el primer reporte de SARM, destacándolo como importante causa de infección nosocomial en Europa (Gil, 2000).

En el periodo de 1975-1980 se extendió a EE.UU. provocando graves infecciones intrahospitalarias. En 1968 describieron el primer brote epidémico causado por SARM en un hospital de Boston. De los años 70 en adelante, aumento la incidencia en Irlanda y en los inicios de la década de los 80 se extendió a Japón, reportándose en la actualidad en distintos lugares del mundo (Gil, 2000).

V. Hipótesis

Existe la presencia de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (SARM) en la leche cruda bovina producida en la finca “HR” en el sector Caño Negro, Municipio Samuel Darío Maldonado del Estado Táchira en el periodo de 2012-2013.

VI. Objetivos de la Investigación

6.1. Objetivo General

Determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (SARM) en la leche cruda bovina producida en el sector Caño Negro del Estado Táchira en el periodo de 2012-2014.

6.2. Objetivos Específicos

- Establecer la presencia de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (SARM) en la leche cruda de los rebaños bovinos.
- Conocer el perfil antimicrobiano de las cepas aisladas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MATERIALES

7.1.1. Material biológico

Diez muestras de 500 mL de leche cruda obtenidas de las vacas presentes en la finca.

7.1.2. Muestras

Se analizaron las muestras de leche cruda, obtenidas de las cantaras en Finca “HR” del sector Caño Negro, El Municipio Samuel Darío Maldonado, se encuentra ubicado al Norte del Estado Táchira. Su capital La Tendida ubicada a una distancia de San Cristóbal de 133 Km., Maracaibo 422 a.m., Mérida 130 Km.

7.1.3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados se preparó a partir de las formas deshidratadas suministradas por las casas comerciales o mezclando los constituyentes del medio, de acuerdo a la fórmula correspondiente. Se reconstituyeron con agua destilada y posteriormente se esterilizaron en autoclave.

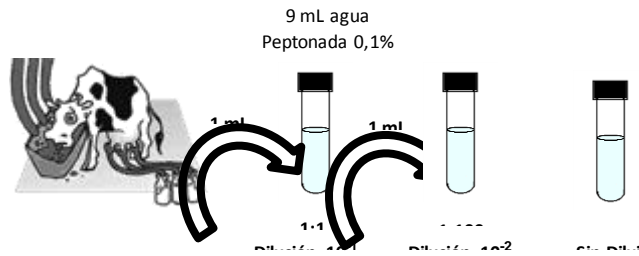
7.1.4. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

7.2. METODOLOGÍA

7.2.1. Tratamiento de la muestra.

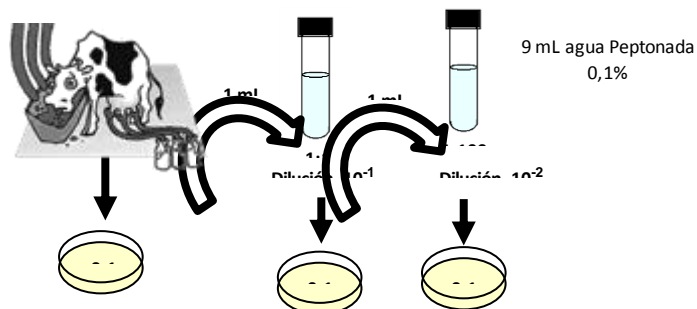
Las muestras de leche fueron recolectadas en frascos de 500 mL y se refrigeran para su traslado al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se tomó de cada frasco 1 mL y se añadió en un tubo con 9 mL de agua peptonada estéril al 0,1%, obteniéndose la dilución 1/10, se repitió el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución 1/100, procedimiento que se repitió por cada muestra recolectada. (Esquema 1)



Esquema 1.-Procedimiento para el tratamiento de la muestra.

7.2.2. Determinación del número de *Staphylococcus aureus*.

Para la investigación de *Staphylococcus aureus* se utilizó el medio de agar Baird-Parker. Se inoculó con un rastrillo o varilla acodada, por duplicado, con 0,1 mL de cada una de las diluciones preparadas anteriormente. Las placas se incubaron a 37°C, por un periodo de 24 a 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación se realizó el cálculo correspondiente para expresar los resultados de los contajes en placas como unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/mL).



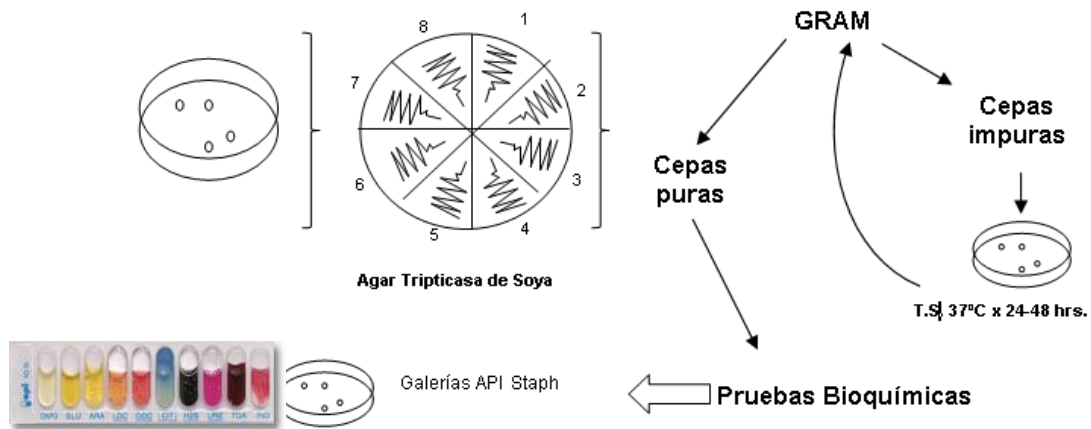
Esquema 2.- Agar Baird-Parker para determinación de *S. aureus*.
Incubar a 37°C por 24-48 horas.

7.2.3. Aislamiento

Una vez inoculado el agar Baird-Parker, se procedió a aislar en agar Tripticasa de Soya, las colonias características de *Staphylococcus aureus*, se incubó a 37°C por 24

a 48 horas. Al finalizar el tiempo de incubación se procedió a realizar la coloración de Gram, a las colonias aisladas para verificar que los aislados sean puros y que correspondan a cocos Gram positivos. (García E, Pérez N, Riera C, Velazco J. 2001)

Los aislados puros se inocularon en las galerías API Staph para su identificación.



Esquema 3.- Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*.

7.3. Prueba de sensibilidad a antibióticos.

Para determinar el perfil de susceptibilidad a antibióticos de las cepas bacterianas aisladas, se utilizó el método Kirby Bauer (García E, Pérez N, Riera C, Velazco J. 2001)

El fundamento consiste en el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a

tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo el Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards).

7.3.1. Procedimiento

Para obtener resultados confiables y reproducibles mediante este método, es imprescindible seguir fielmente las instrucciones que daremos a continuación:

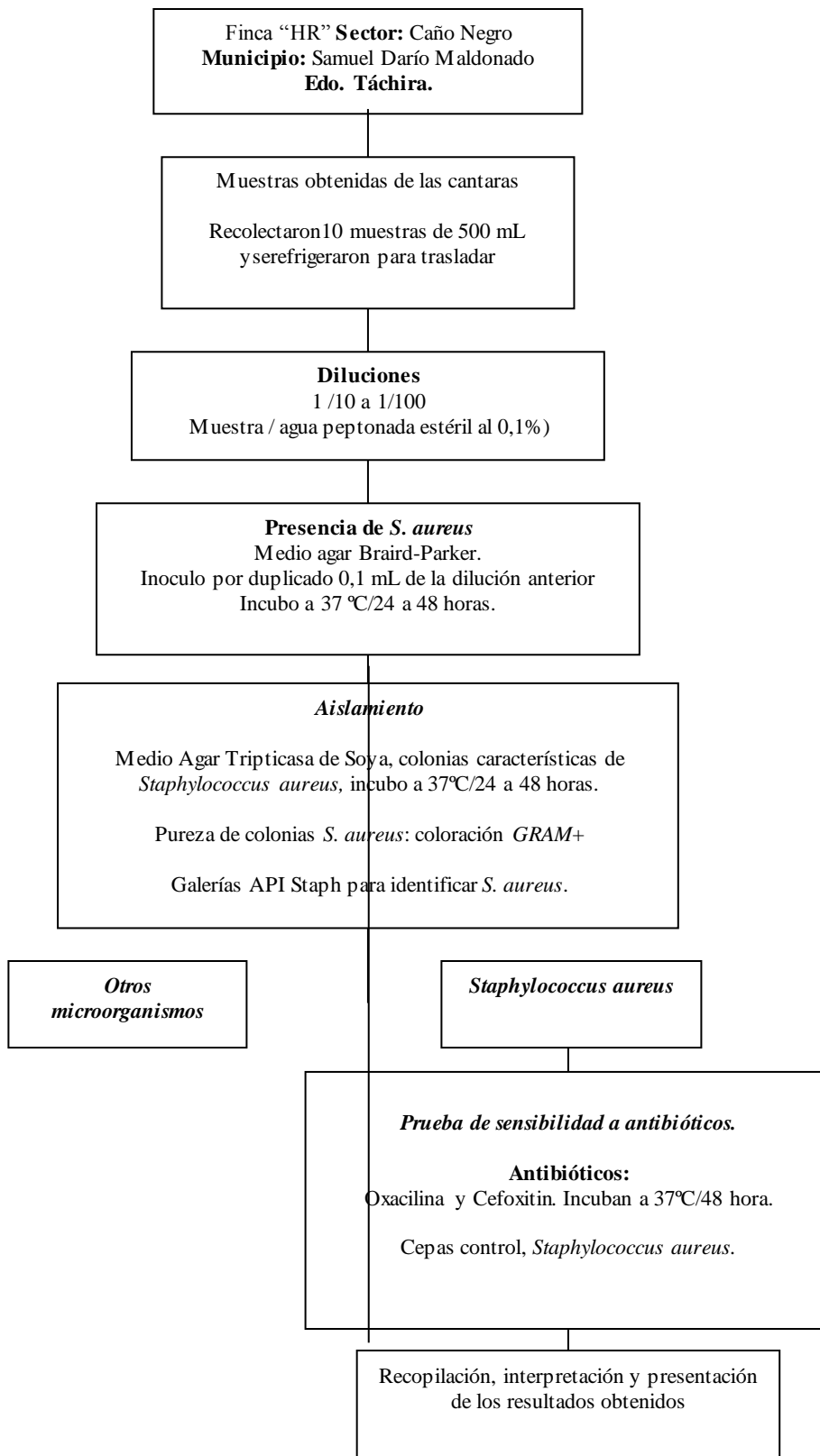
1. Funda el medio de cultivo y déjelo enfriar a 45-50°C.
2. Vierta asépticamente suficiente cantidad de medio de cultivo en una placa de Petri, para obtener una capa de 4 mm. de espesor. Para una placa de 10 cm. de diámetro se requieren 30 mL de medio y para una de 15 cm. se requieren 70 mL.
3. Deje solidificar el medio de cultivo y luego seque las placas durante 30 minutos antes de usarlas para la inoculación.
4. Inocule la placa mediante un hisopo estéril utilizando una suspensión del germen de 18 a 24 horas de incubación con una turbidez equivalente a $1,5 \times 10^6$ bacterias (Equivale al tubo N° 0,5 de la escala de McFarland). Para la inoculación sumerja un hisopo estéril en el cultivo y elimine el exceso rotándolo firmemente contra la pared interna del tubo. Frote el hisopo sobre la superficie del medio de cultivo.
5. Repita esta operación por tres veces sucesivas, rotando la placa para obtener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie.
6. Coloque la tapa a la placa y deje secar el inóculo por 3 a 5 minutos.
7. Coloque los discos con los antibióticos sobre el agar mediante pinzas estériles o usando un aplicador de discos. Oprima los discos suavemente con una pinza para asegurar un buen contacto con el medio de cultivo. Los discos deben estar espaciados de manera que su distancia a la pared de la placa sea de 15 mm. y entre ellos de 30 mm.
8. Incube a 35 – 37°C hasta el siguiente día (aproximadamente 18-19 horas).

Si se requieren los resultados con rapidez se pueden leer las zonas de inhibición después de 6-8 horas de incubación, pero estos resultados deben ser confirmados mediante una nueva lectura después de la incubación por las 18 -19 horas.

9. La medida del diámetro de la zona de inhibición se hace preferentemente desde el exterior de la placa, sin quitar la tapa, esto puede hacerse con una regla milimetrada, un vernier o cualquier otro Instrumento similar.

10. Los resultados se interpretan de acuerdo con el anexo 1

11. Ensayos de control con microorganismos cuya sensibilidad se conoce, tales como el *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, deben ser efectuados simultáneamente con el de los gérmenes en estudio y las zonas de inhibición obtenidas con ellos deben estar comprendidas entre los valores indicados en el anexo 2



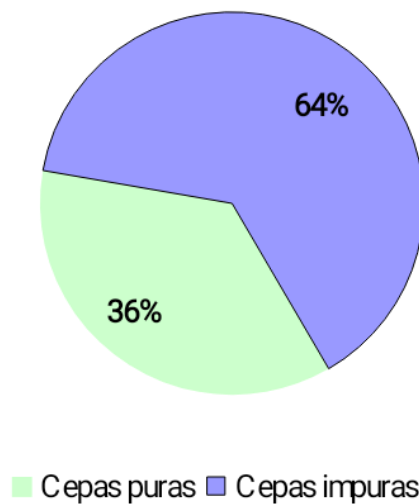
Esquema 4.- *Flujograma de trabajo*

VIII. RESULTADOS

Tabla 1.- *Distribución porcentual cepas puras e impuras*

	Frecuencia relativa	%
Cepas puras	05	36%
Cepas impuras	09	64%
Total	14	100%

De las catorce muestras recolectadas de leche cruda en la finca “HR” del sector Caño Negro, Municipio Samuel Darío Maldonado, Estado Táchira, había presencia de colonias de microorganismos, todos cocos Gram positivos, el 36% (05) fueron cepas puras de *Staphylococcus aureus* y 64% (09) cepas impuras.



Gráfica 1.- *Distribución porcentual cepas puras e impuras*

Tabla 2.- Resistencia y sensibilidad del *Staphylococcus aureus*

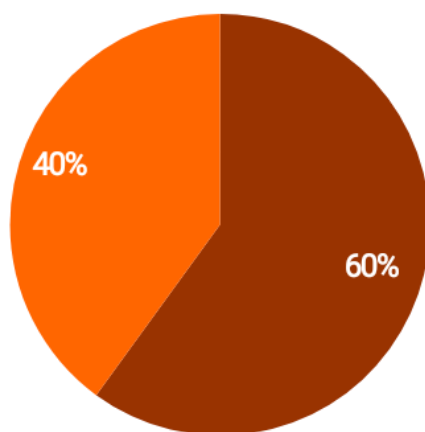
Cepas N°	Oxacilina ¹	Cefoxitina ²
1	Resistente	Resistente
2	Sensible	Sensible
3	Resistente	Resistente
4	Resistente	Resistente
5	Intermedio	Intermedio

⁽¹⁾ Resistente ≤ 10 mm, Intermedio 11 -12 mm, Sensible ≥ 13 mm ⁽²⁾ Resistente ≤ 14 mm, Intermedio 15 -17 mm, Sensible ≥ 18 mm

De las cepas puras de *S. aureus*, se les realizo la prueba de resistencia antibiótica con oxacilina y cefoxitin. Según lo establece CSLI. Siendo el 60% (3) SARM.

Tabla 3.- Distribución porcentual de la resistencia a la metilicina

	Frecuencia relativa	%
SARM	03	60%
SANRM	02	40%
Total	05	100%



■ SARM ■ SANRM

aphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM) Staphylococcus aureus no resistente a la meticilina (SANRM)

Gráfica 2.- *Distribución porcentual de la resistencia a la meticilina*

IX. DISCUSIÓN

En lo reportado por Ruusune y col. (2013), en donde determinaron la prevalencia en leche cruda de *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Yersinia enterocolitica* y *Bacillus cereus*. Encontraron la presencia de patógenos, lo que sugiere que están presentes a pesar de aplicar excelentes condiciones higiénico-sanitarias. En un mismo orden de ideas Kuang y col. (2009), encontró en leche cruda bovina, bacterias heterótrofas mesófilas como las especies *Klebsiella oxytoca*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; que representan la ecología microbiana y biodiversidad de la leche. Nuestros resultados no difieren de los encontrados por la autora, llegando a las mismas conclusiones sanitarias.

Vendier-Metz y col. (2012), determinan la influencia de la biodiversidad bacteriana presente en la piel del pezón de la vaca y su influencia en la preparación de queso madurado, en donde pone de manifiesto la gran diversidad bacteriana en la piel de las vacas y los quesos. Por su parte, Signorini y col. (2012), en donde evaluaron las condiciones higiénicas sanitarias en la producción primaria de leche, advierten sobre la manipulación inadecuada de la materia prima. En un mismo orden de ideas, Sim Kheng y col. (2012), determino que la higiene personal de los manipuladores, así como la higiene en los utensilios empleados durante el proceso de ordeño, contribuyen a la diversidad de la población de bacterias heterótrofas. En el presente trabajo encontramos algunas debilidades por parte de los obreros, ya que no siguen un protocolo de higiene.

Akineden y col, en el 2001 comparan el fenotipo y genotipo de 103 cepas aisladas de muestras de leche de 60 vacas con mastitis y con presencia de *Staphylococcus aureus*. Reportando que un número mínimo de clones parecía ser responsable de los casos de mastitis bovina en los distintos parques. Nuestros estudios reportan resultados similares en cuanto a la presencia de *S. aureus* en las muestras analizadas.

Los reportes de Hill y col., (2012) en donde refieren la aparición de agentes patógenos tales como las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia*

coli, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* y *Salmonella enterica*; en leche cruda, es un problema común en las fincas productoras de leche, por lo que el control en la pasteurización antes del consumo sigue siendo primordial. Aunque nuestro estudio se enfocó exclusivamente en la presencia de *Staphylococcus aureus* apoyamos las conclusiones a las que llegó Hill.

Calderón y col. (2006), analizaron leche cruda en diferentes regiones de Colombia, consideran que en las zonas frías las bajas temperaturas ambientales retardan el crecimiento bacteriano, sin embargo, un alto conteo de aeróbico mesófilos se encontró en las zonas con máximas precipitaciones fluviales, relacionando esto con las malas condiciones higiénicas de los establos, de los sitios de ordeño y de los operarios, así como la calidad bacteriológica del agua usada para la limpieza y desinfección de los pezones. En el presente trabajo creemos que esto se puede asociar de igual manera a nuestros resultados aunque no era parte del estudio.

Zadoks y col. (2002), cuyo objeto de estudio fue comparar las cepas obtenidas para evaluar el papel de los equipos de ordeño y la piel como fuentes de *S. aureus* en mastitis. *Staphylococcus aureus* aislados de la piel de los pezones de la especie bovina, la piel humana, el equipo de ordeño, la leche de vaca y por medio de electroforesis en gel de campo pulsado, los autores refieren que, cepas de la piel y la leche pueden transmitirse a través de la maquinaria de ordeño, pero que las cepas de piel no son fuente importante de la presencia de *S. aureus* intramamario en las infecciones de las vacas lecheras.

En cuanto a la resistencia meticilínica, Huber y col. (2011), en su estudio titulado: Predominio y características de *Staphylococcus aureus* metilino-resistente, encontró que el 46.4% de las muestras de leche de tanque y carne picada fueron positivas en SARM. Nuestros resultados son moderadamente bajos 36% SARM, tomando en consideración que los tamaños muestrales son diferentes.

Rivera y col. (2011), en donde determinan la susceptibilidad del *Staphylococcus aureus* procedentes de quesos comercializados en el Estado Zulia-Venezuela.

Encontrando SARM por su capacidad de crecimiento en placas hipersalinas suplementadas con oxacilina. Nuestros resultados no difieren de los encontrados por el autor exceptuando que la muestra analizada fue leche cruda.

Huber y col. (2009), encontró en 142 muestras de leche con mastitis, dando 2 casos de SARM 1,4%. Nosotros encontramos un 60%, sin embargo se ha de considerar que el tamaño de la muestra difiere considerablemente.

Palma y col. (2007) reportaron que la leche cruda de origen bovino, al sur del Edo. Aragua, no existe una buena práctica de ordeño o manejo de ordeño en las fincas estudiadas, en más del 60% se encontró bacterias heterótrofas tales como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y diversas especies de *Pseudomonas*. Nuestros resultados fueron superiores ya que se encontraron en todas las muestras presencia bacteriana, con lo que se constataría la falta de controles sanitarios en cada uno de los puntos críticos de ordeño.

3. X CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se constato la carga bacteriana y la resistencia del *S. aureus* presente en el ganado vacuno de la finca “HR” del sector Caño Negro, Municipio Samuel Darío Maldonado, Estado Táchira.

Sólo se encontraron catorce colonias de microorganismos de los cuales cinco fueron del genero *Staphylococcus aureus* en la leche cruda obtenida de las diez vacas presentes en la finca. Los ensayos de resistencia del *Staphylococcus aureus* a la meticilina fueron positivos para tres de las cinco cepas.

La importancia del control microbiológico en cada una de las fases del sector ganadero permiten garantizar la buena calidad del producto terminado así como el tomar las medidas correctivas y cautelares que garanticen el optimo estado del producto terminado.

El problema del no control microbiológico del ganado y la falta de seguimiento de los antibióticos veterinarios suministrados conllevan a la creación de resistencia microbiológica y por ende a pérdidas económicas y de salubridad de los productos de consumo obtenidos por el ganado.

Se sugiere continuar y ampliar el trabajo en las demás fincas aledañas a la finca “HR” del sector Caño Negro, Municipio Samuel Darío Maldonado, Estado Táchira.

I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Actualidad Ganadera (2014) *Estrategias para reducir el conteo de células somáticas* (Consultado julio 2014) Disponible por internet <http://www.actualidadganadera.com/articulos/estrategias-para-reducir-el-conteo-de-celulas-somaticas.html>

“*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en la comunidad: la emergencia de un patógeno”, por Medicina (Buenos Aires). [En línea]. 2011, vol. 71, nro. 6, pág. 1. Disponible por Internet: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_

Administración de Drogas y Alimentos de los EE.UU. (2006) *Información sobre alimentos, los riesgos de la leche sin pasteurizar* Disponible por Internet: <http://www.administracion.usmp.edu.pe/institutoconsumo/wp-content/uploads/2013/08/Riesgos-de-la-leche-sin-pasteurizar-FDA.pdf>

Akineden O, Annemuller C, Hassan A, Lammler C, Wolter W, Zschock M (2001). *Toxin Genes and Other Characteristics of Staphylococcus aureus Isolates from Milk of Cows with Mastitis*. Clinical and Diagnostic Laboratory immunology, 8 (5): 959-964.

Allen J, Cowan M, Cockroft P (1994). *A comparison of three semi-selective media for the isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Journal Medical Microbiology, 40: 98-101.

Arias, Fidias G (2006) *El proyecto de investigación, introducción a la metodología científica 5^{ta} ed.* Editorial Epsteme C.A.

Aulacio, P. M. (Febrero 2002). *Laboratorio de microbiología – antibiograma determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibioticos (ANTIBIOGRAMA)*. Caracas: Universidas Central de Venezuela.

Barrios A (1988). *Bacteriología y Virología Básicas*. 1^{ra} ed. Mérida, Venezuela: Editorial Venezolana C.A.

Barrios de Moreno A (1996) *Microbiología General* Universidad de los Andes Facultad de Farmacia Mérida – Venezuela ISBN 980-221-788-3

- Blanco O, Miguel Á** (2013) *calidad sanitaria de la leche secretaria*
- Cantón R, Ruiz-Garbajosa Patricia.** (2013) Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.) *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31 (8) , Pág. 543-551 Disponible por Internet: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X13002097?via=sd>
- Clinical and Laboratory Standards Institute.**(2007). *Analysis and presentation of Cumulative antimicrobial test data: approved guideline* Third Edition, *De medicina zootecnia y extensionismo* Departamento de Zootecnia Disponible por internet:http://www.fedmvz.com/progan/13/13.calidad_leche.pdf
- Ellner Richard** (2000) *Microbiología de la leche y los derivados lácteos, preguntas y respuestas* Ediciones Días de Santos S.A. Madrid España ISBN 84-7978-5
- Gabriela Giacoboni** (2013) Resistencia a los antimicrobianos en medicina veterinaria y su relación con la salud pública, *Información Veterinaria (CMVPC)*, Boletín 175:31 - 33.FCV UNLP Sitio Argentino de Producción Animal Disponible por Internet: http://www.produccionbovina.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/Zoonosis/31-resistencia.pdf
- Galiana A.** (2003). *Infección por Staphylococcus aureus meticilino resistente adquirido en la comunidad.* *Archivo pediátrico Uruguay*, 74 (1).
- García E, Pérez N, Riera C, Velasco J** (2001) *Manual practico de bacteriología general*, Farmacia - Escuela de Bioanálisis Cátedra de bacteriología ULA
- Gil M.** (2000). *Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la Resistencia a meticilina.* *Revista Chilena de Infectología*, 17 (2): 145-152.
- Hata E, Katsuda K, Kobayashi H, Uchida I, Tanaka K, Eguchi M** (2010). *Genetic Variation among Staphylococcus aureus Strains from Bovine Milk and Their Revelance to Methicillin-Resistant Isolates from Humans.* *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (6): 2130-2139.
- Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C** (2009). *Prevalence and characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland.* *Euro Surveill*, 15 (16): 1-4.

- Huber H, Ziegler D, Pfluger V, Vogel G, Zweifel C, Stephan R** (2011). *Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons*. BMC Veterinary Research, 7 (6): 1-7.
- Kwon N, Park K., Moon J, Jung W, Kim S, Kim J, Hong S, Koo H, Joo Y, Park Y** (2005). Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56: 624-632.
- Lee J** (2003). Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. Applied and Environmental Microbiology, 69 (11): 6489-6494.
- Margariños, H.** (2000). Producción Higiénica de la Leche Cruda. Edición. Chile: Producción y Servicios Incorporados S.A.
- Murray, P.** (1995). Manual of Clinical Microbiology. 6th Edition.
- Murray, P., Rosenthal, K., Kobayashi, G., Pfaller, M.** (2002). Microbiología Médica. Cuarta Edición. España: EdiDe, S.L.
- Osteopathic Association American.** (2006). Fundamentos de Medicina Osteopática. Segunda Edición. España: Editorial Médica Panamericana.
- Pahissa, Albert** (2009) *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus* 1^{ra} ed Barcelona España editorial IGC Marge SI ISBN 978-84-92442-27-0
- Pascual Anderson, Maria del Rosario** (2005) *Enfermedades de origen animalario, su prevención*, ediciones Días de Santos S.A. ISBN 84-7978-682-5 España
- Prescott, L., Harley, J., Klein, D.** (1999). Microbiología. P. 60-64, Cuarta Edición. McGraw Hill. Interamericana de España.
- Rivera, J., Mujica, I., Aranaga, V., Navarro, C., Zabala, I., Atencio, L.** (2011). *Staphylococcus aureus* Procedentes de quesos: susceptibilidad a antibióticos y su relación con plásmidos. Revista Científica, 21 (3): 202-210.
- Sopena, N., Sabria, M.** (2002). *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina. Med Clin (Barc), 118 (17): 671-676.

Spreer, E. (1991). Lactología industrial, 2a Edición, Editorial acribia, Zaragoza, España.

Tortora; Funke y Case. (2007) Introducción a la microbiología 9^{na} ed. Pag 3 Editorial Medica Panamericana S.A. Argentina ISBN 978-950-06-0740-7

Zadoks, R., Leeuwen, W., Kreft, D., Fox, L., Barkema, H., Schukken, Y., Belkum, A. (2002). Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Human Skin, Milking Equipment, and Bovine Milk by Phage Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. Journal of Clinical Microbiology, 40 (11): 3894-3902.

ANEXOS

Anexo 1.- Interpretación del método Kirby-Bauer

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro de la zona de inhibición en mm		
		Resistente < o =	Intermedio	Sensible > o =
BETALACTÁMICOS, PENICILINAS				
Ampicilina <i>Enterobacteriaceae</i>	10 µg	13	14-16	17
Ampicilina Estafilococos	10 µg	28	---	29
Ampicilina Enterococos	10 µg	16	---	17
Ampicilina Estreptococos β hemolíticos	10 µg	18	19-25	26
Mezlocilina <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75 µg	15	---	16
Mezlocilina <i>Enterobacteriaceae</i>	75 µg	17	18-20	21
Oxacilina Estafilococos	1 µg	10	11-12	13
Oxacilina Neumococos para evaluar sensibilidad a penicilina	1 µg	---	---	20
Penicilina G Estafilococos	10 U	28	---	29
Penicilina Enterococos	10 U	14	---	15
Penicilina Estreptococos β hemolíticos	10 U	19	20-27	28
Piperacilina <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 µg	17	---	18
Piperacilina <i>Enterobacteriaceae</i>	100 µg	17	18-20	21
COMBIN. CON INHIBIDORES B-LACTAMASA				
Amoxicilina / Acido Clavulánico Estafilococos	20/10 µg	19	---	20
Amoxicilina / <i>Enterobacteriaceae</i>	20/10 µg	13	14-17	18
Ampicilina / Sulbactama	10/10 µg	11	12-14	15
Piperacilina / Tazobactama Enterobacterias	100/10 µg	17	18-20	21
Piperacilina / <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100/10 µg	17	---	18
Piperacilina / Esafilococos meticilina S	100/10 µg	17	---	18
CEFALOSPORINAS				
Cefaclor	30 µg	14	15-17	18
Cefazolina	30 µg	14	15-17	18
Cefepima	30 µg	14	15-17	18
Cefixima	5 µg	15	16-18	19
Cefoperazona	75 µg	15	16-20	21
Cefotaxima	30 µg	14	15-22	23
Cefoxitina	30 µg	14	15-17	18
Ceftazidima	30 µg	14	15-17	18
Ceftioxizima	30 µg	14	15-19	20
Ceftriaxona	30 µg	13	14-20	21
Cefuroxima sódica parenteral	30 µg	14	15-17	18
Cefalotina	30 µg	14	15-17	18

Fuente Aulacio,2002

Interpretación del método Kirby-Bauer continuación

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro de la zona de inhibición en mm		
		Resistente < o =	Intermedio	Sensible > o =
BETALACTÁMICOS, PENICILINAS				
Ampicilina <i>Enterobacteriaceae</i>	10 µg	13	14-16	17
Ampicilina Estafilococos	10 µg	28	---	29
Ampicilina Enterococos	10 µg	16	---	17
Ampicilina Estreptococos β hemolíticos	10 µg	18	19-25	26
Mezlocilina <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75 µg	15	---	16
Mezlocilina <i>Enterobacteriaceae</i>	75 µg	17	18-20	21
Oxacilina Estafilococos	1 µg	10	11-12	13
Oxacilina Neumococos para evaluar sensibilidad a penicilina	1 µg	---	---	20
Penicilina G Estafilococos	10 U	28	---	29
Penicilina Enterococos	10 U	14	---	15
Penicilina Estreptococos β hemolíticos	10 U	19	20-27	28
Piperacilina <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 µg	17	---	18
Piperacilina <i>Enterobacteriaceae</i>	100 µg	17	18-20	21
CARBAPENEMS				
Imipenem	10 µg	13	14-15	16
Meropenem	10 µg	13	14-15	16
MONOBACTAMAS				
Aztreonam	30 µg	15	16-21	22
GLICOPÉPTIDOS				
Teicoplanina	30 µg	10	11-13	14
Vancomicina Enterococos	30 µg	14	15-16	17
Vancomicina Estafilococos	30 µg	---	---	15
AMINOGLUCÓSIDOS				
Amicacina	30 µg	14	15-16	17
Gentamicina	10 µg	12	13-14	15
Kanamicina	30 µg	13	14-17	18
Netilmicina	30 µg	12	13-14	15
MACRÓLIDOS				
Azitromicina	15 µg	13	14-17	18
Claritromicina	15 µg	13	14-17	18
Eritromicina	15 µg	13	14-22	23
TETRACICLINAS				
Minociclina	30 µg	14	15-18	19
Tetraciclina	30 µg	14	15-18	19
QUINOLONAS				
Ciprofloxacina	5 µg	15	16-20	21
Fleroxacina	5 µg	15	16-18	19
Nalidíxico Ácido	30 µg	13	14-18	19
Norfloxacina	10 µg	12	13-16	17
Ofloxacina	5 µg	12	13-15	16
Trovafloxacina	10 µg	13	14-16	17
OTROS ANTIMICROBIANOS				
Cloranfenicol	30 µg	12	13-17	18
Clindamicina	2 µg	14	15-20	21
Nitrofurantoína	300 µg	14	15-16	17
Polimixina B	300 U	8	9 - 11	12
Rifampicina	5 µg	16	17-19	20
Sulfonamidas	300 µg	12	13-16	17
Trimetoprima + Sulfametoxazol	1.25/23.75 µg	10	11-15	16

Anexo 2.- Controles método Kirby-Bauer

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN DEL DISCO	DIÁMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN (en mm)	
		CON <i>S. aureus</i> ATCC 25923	CON <i>E. coli</i> ATCC 25922
Ampicilina	10 µg	24-35	15-20
Bacitracina	10 U	17-22	---
Cefalotina	30 µg	25-37	18-23
Cloramfenicol	30 µg	19-26	21-27
Colistina	10 µg	-	11-15
Eritromicina	15 µg	22-30	8-14
Gentamicina	10 µg	19-27	19-26
Kanamicina	30 µg	19-26	17-25
Metilicina	5 µg	17-22	-
Neomicina	30 µg	18-26	17-23
Novobiocina	30 µg	22-31	-
Oleandomicina	15 µg	19-28	-
Penicilina G	10 U	26-37	-
Polimixina B	300 U	7-13	12-16
Estreptomicina	10 µg	14-22	12-20
Tetraciclina	30 µg	19-28	18-25
Vancomicina	30 µg	15-19	-