

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA ZOOTECNIA

Aislamiento e Identificación
de Gérmenes Aerobios
en Quesos Frescos.

T E S I S

Que para obtener el título de:

Médico Veterinario y Zootecnista

p r e s e n t a :

RICARDO DIAZ VILLALOBOS

CON CARINO Y AGRADECIMIENTO A MIS
PADRES QUE CON SU DEDICACION Y ES-
FUERZO LOGRARON MI FORMACION UNI-
VERSITARIA, SEA ESTA UNA RECOMPEN-
SA A SU SACRIFICIO.

A MIS HERMANOS COMO RECONOCIMIEN-
TO DE SU AYUDA:

Ma. EUGENIA

RAMON

ROSA Ma.

MARTHA

LETICIA

Ma. DEL CARMEN

Ma. DEL SOCORRO

ARTURO JAVIER

BLANCA ESTELA

IRMA PATRICIA

CON AGRADECIMIENTO Y ESTIMACION AL
DR. RAMON FERNANDEZ DE CEVALLOS,
FUNDADOR, MAESTRO Y DIRECTOR DE
NUESTRA QUERIDA ESCUELA, QUE TANTO
HA HECHO POR LA SUPERACION PROFE-
SIONAL DE CADA UNO DE SUS ALUMNOS.

DEDICO ESTA A TODOS MIS COMPAÑEROS
DE GENERACION, DE ESCUELA Y DE ES-
TUDIOS, Y A TODOS MIS AMIGOS, QUE DE
UNA U OTRA MANERA ME BRINDARON
SU AYUDA Y APOYO.

A TODOS Y CADA UNO DE MIS MAESTROS,
POR SU DESINTERESADA Y MERITORIA
LABOR EN LA FORMACION DE MEDICOS
VETERINARIOS ZOOTECNISTAS.

AL H. JURADO:

M.V.Z. ARTURO LADRON DE GUEVARA
M.V.Z. NORBERTO ALCOCER
M.V.Z. EDUARDO NEVAREZ
M.V.Z. LUIS URIBE C.
M.V.Z. LAURA IMELDA OROZCO

INTRODUCCION

Los quesos son una forma de conservación de los dos componentes insolubles de la leche: la caseína y la materia grasa; se obtienen por la coagulación de la leche seguida del desuerado en el curso del cual el lactosuero se separa de la cuajada. El lactosuero contiene la mayor parte del agua y los componentes solubles de la leche, quedando una pequeña parte aprisionada en la cuajada. La definición legal del queso precisa que "el producto puede estar o no fermentado"; de hecho experimenta por lo menos una fermentación láctica. El queso descremado se obtiene a partir de la leche descremada.

El queso es un alimento universal, que se produce en casi todas las regiones del globo a partir de la leche de diversas especies de mamíferos. Los quesos se encuentran entre los mejores alimentos del hombre no solamente en razón de su acusado valor nutritivo (materias nitrogenadas bajo diferentes formas, materias grasas, calcio, fósforo, etc.), sino también en razón de las cualidades organolépticas extremadamente variadas que poseen, ya que la variedad es fuente de placer. (6)

El origen del queso se pierde en la noche de la historia no escrita. Autores griegos y romanos describieron formas de hacer quesos, varios siglos antes del nacimiento de Cristo; se sabe que ya se hacía queso mucho antes de aquel entonces. Los pueblos primitivos aprendieron que la cuajada de la leche agria podía concentrarse exprimiéndola y secándola parcialmente, y que el producto podía guardarse mucho más tiempo que la propia leche agria. Muy pronto los que hacían quesos se sirvieron de leches de cabra, oveja, vaca, búfalo, yegua, burra y quizá de otros animales. La leche se cuajó de diversas maneras (dejándola agriar naturalmente, con cuajo tomado de animales lactantes, con vinagre o con los jugos de ciertas plantas). A menudo se añadieron a la cuajada sal y especias, y algunas variedades de queso se ahumaron. Muchos de estos procedimientos están todavía en uso.

GRUPOS PRINCIPALES DE QUESOS

- I.—Quesos naturales.
 - A. Frescos, blandos:
 - 1.—De bajo contenido de grasa: requezón y queso para pastelería.
 - 2.—De alto contenido de grasa: crema y Neufchatel.
 - B. Madurados:
 - 1.—Quesos duros para rallar: Romano, Parmesano y Aciago añejo.
 - 2.—Duros: Cheddar, Suizo, Gruyére, Provolone.
 - 3.—Semiblandos: Roquefort, Azul, Gorgonzola, Brick, Limbuger.
 - 4.—Blandos: Camembert, Brie, Liederkranz.
- II.—Quesos elaborados y pasteurizados (cocidos), alimentos caseosos y quesos para untar.
- III.—Quesos de suero: Mysost y Ricota (I).

Aún cuando las dependencias oficiales del Estado no tienen datos sobre consumo y producción de los quesos (sobre todo los del tipo fresco), éstos se consumen en gran cantidad en la ciudad de Guadalajara. (2)

Es por lo tanto importante conocer la evaluación y determinación de flora aerobia presentes en este material, ya que, repercute como un problema de Salud Pública, tomando en cuenta en primer lugar, la falta de higiene de la materia prima; leche, que como reporta la Dra. Laura I. Orozco en su trabajo: "Estimación bacteriana y aislamiento de gérmenes aerobios en leche no pasteurizada"; dentro de la clasificación para la leche que se destina para la pasteurización del tipo común, sólo se encuentran un 3.9%. En la clasificación de las leches para destinarla a la pasteurización del tipo preferente con un máximo de 750,000 col./c.c. con un mínimo de 150,000 col./c.c., que pertenecen a otra categoría, están 40 muestras que corresponden a un 15.7%. (3)

En el siguiente cuadro se resumen las estadísticas americanas realizadas durante 17 años (1923-1939) y muestra la im-

Azúcares.

- a) Manitol
- b) Sucrosa
- c) Inulina
- d) Lactosa
- e) Raffinosa
- f) Trealosa
- g) Sorbitol

“ METODOLOGIA ”

Se toma un gramo de muestra que se deposita en el mortero previamente esterilizado, se tritura con la mano del mismo, el contenido se vierte en un primer tubo bacteriológico conteniendo 9 c.c. de agua destilada estéril, se agita para homogenizar la solución; se toma 1 c.c. de la dilución contenida en el primer tubo y se deposita en un segundo tubo conteniendo la misma cantidad de agua destilada estéril; y así sucesivamente hasta el octavo tubo.

De cada uno de los tubos se toma 1 c.c. y se deposita en cajas de Petri estériles, tomándolas de derecha a izquierda.

Se vacía el medio de agar nutritivo previamente esterilizado y enfriado a una temperatura de 45° C., se dejan solidificar, posteriormente se meten las cajas a la estufa bacteriológica a incubar a 37° C. durante 24 horas.

Al cabo de 24 horas se observan las cajas y se hace el conteo de colonias.

A partir del primer tubo donde se hubo colocado previamente la muestra, se hace la siembra en Selenite y en Gelosa Sangre.

Se dejan 24 horas a la estufa bacteriológica a incubar, a 37° C. Enseguida se observan los crecimientos que haya en gelosa sangre identificando el tipo de colonias, mediante la tinción de Gram. de dichas colonias y por su tamaño y coloración y tipo.

Si las colonias son pequeñas, redondas, transparentes, hemolíticas y Gram +, se someten a una reacción bioquímica con los siguientes azúcares: Sucrosa, Manitol, Lactosa, Sorbitol, Raffinosa, Trealosa, Inulina.

De las colonias blanquecinas o con pigmento dorado, se procedió a hacer una tinción de Gram, y prueba de la catalaza para diferenciar entre Staphilococoa y Micrococos.

A partir del Selenite se hace la resiembra en Verde brillante, dejándose 24 horas a 37° C., en la estufa bacteriológica, después se observa el tipo de colonias, siendo las de color verdoso, con bordes regulares, lisas, con cambio de color en el medio a verde son Escherichia Coli.

Las colonias mucoides verdosas y de bordes continuados son del tipo Aerobacter-Klebsiella.

No.	Especi- ficación.	Evaluación de Colonias ..	Escherichia Coli	Aerobacter Klebsiella.	Str. Fecalis.	Str. Agalactie.	Str. Dysgalactie.	Str. Pyogenes.	Str. Uberis.
1		550,000,000	+						
2		71,000	+						
3		54,000'000,000	+						
4		473'000,000	+						
5		78,200'000,000	+						
6		38,700'000,000	+						
7		179'000,000	+						
8		2,040'000,000	+						
9		490'000,000	+						
10		4,150'000,000	+						
11		780'000,000	+						
12		198'000,000	+						
13		57,400'000,000	+						
14		203'000,000	+						
15		3,510'000,000	+						
16		324'000,000	+						
17		28'000,000	+						
18		259'000,000	+						
19		242'000,000	+						
20		316'000,000	+						

No.	Especi- ficación.	Evaluación de Colonias	Escherichia Coli	Aerobacter Str. Klebsiella. Fecalis.	Str. Agalactie.	Str. Dysgalactie.	Str. Pyogenes.	Str. Uberis.
21		148'000,000	+					
22		192'000,000	+					
23		3,940'000,000	+					
24		193'000,000	+					
25		2,330'000,000	+					
26	R	9'700,000	+					
27	P	33'000,000	+					
28		343'000,000	+					
29		310'000,000	+					
30		439'000,000		+				
31		640'000,000	+					
32	R	286'000,000	+		+			
33		3,300'000,000	+					
34	P	357'000,000	+					
35	R	462'000,000	+					
36	P	416'000,000	+					
37	R	296'000,000	+	+		+		
38		248'000,000	+					
39		1,870'000,000	+					
40	P	1,870'000,000	+					

No.	Especi- ficación.	Evaluación de Colonias	Escherichia Coll	Aerobacter Klebsiella.	Str. Fecalis.	Str. Agalactie.	Str. Dysgalactie.	Str. Pyogenes.	Str. Uberis.
41		5,550'000,000	+				+		
42		1,860'000,000	+						
43		256'000,000	+						+
44		316'000,000	+		+				
45		448'000,000	+		+				
46		33'600,000	+					+	
47		596'000,000	+						
48		216'000,000	+					+	
49		196'000,000		+			+		
50		324'000,000	+				+		

P-PANELA

R-REQUESON

“INTERPRETACION DE RESULTADOS”

- a) Muestras que contenían menos de 100,000 colonias por c.c. 2%.
- b) Muestras entre cien mil y un millón. Ninguna.
- c) Muestras entre un millón y cien millones. 8%.
- d) Muestras de más de cien millones. 90%.

Porcentajes en la identificación de especies bacterianas:

Escherichia Coli	90.4%
A. Klebsiella	6%
Str. Fecalis	6%
Str. Dysgalactie	6%
Str. Pyogenes	4%
Str. Uberis	2%
Str. Agalactie	2%

“DISCUSION”

.... Encontramos que un 2% de las muestras obtenidas tienen una cantidad inferior a cien mil colonias X gr. de muestra. Un 8% entre un millón y cien millones y un 90% con más de cien millones.

No existe reglamentación oficial especial para quesos en cuanto a estimación bacteriana. (4)

Si tomamos en cuenta la Ley sobre producción y tratamiento y venta de leche y sus derivados en el Estado de Jalisco, la clasificación según el artículo 3o. es la siguiente:

- 1.—Leche Pasteurizada.
- 2.—Leche Preferente.
- 3.—Leche certificada cruda.

Artículo 8.—La leche certificada cruda a que se refiere la fracción III del artículo tercero, sobre la leche certificada cruda fracción II, por el análisis bacteriológico, no acusará más de 150,000 colonias/c.c. por el método de siembra en agar nutritivo. (5)

Artículo 240.—La cuenta bacteriana en la producción deberá dar los siguientes resultados:

- I.—Para la leche que se destine a la pasteurización de tipo común, no más de 150,000 col./c.c. en placas de agar nutritivo.

- II.—Para la leche que se destine a la pasteurización de tipo prefrente no más de setecientos cincuenta mil colonias por c.c. en placas de agar nutritivo.

- III.—Para la leche que se destine a la certificación, previos tres exámenes que se hagan en el transcurso de un mes y antes de ofrecerse al público, un número no mayor de 150,000 col./c.c. en placas de agar nutritivo.

De acuerdo a la ley sobre tratamiento, producción y venta de leche y sus derivados en el Estado de Jalisco, el 98% de las muestras trabajadas no reúnen estas condiciones.

Basándonos sobre todo en el artículo 8 que se refiere a leche certificada cruda que dice que esta leche no acusará más de 150,000 colonias/c.c., en placas de agar nutritivo, si tomamos en cuenta que la mayoría de los quesos se producen a partir de leche cruda, entonces sólo el 2% estaría dentro de esta Ley.

En la identificación de las especies bacterianas encontramos los siguientes resultados: *Escherichia coli*: 90.4%; *A. Klebsiella* 6%; *Str. Fecalis* 6%; *Str. Dysgalactie* 6%; *Str. Pyogenes* 4%; *Str. Uberis* 2%; *Str. Agalactie* 2%.

En estos resultados vemos el alto porcentaje de *E. coli* 90.4% y de *Aerobacter Klebsiella* 6%, teniendo éstas como procedencia principalmente las heces fecales (^o). Encontramos ade-

más un 6% de *Streptococcus fecalis*, ellos han sido aislados tan frecuentemente de fuentes contaminadas por heces y de heces mismas que parece razonable encarar su presencia como indicadores de contaminación fecal (⁹).

La presencia de cualquiera de estos tipos en productos lácteos, es sugestiva, en proporción al número presente de las deficientes medidas sanitarias, o prácticas ocurridas durante su producción y venta. (¹⁰).

La importancia de los estreptococos fecalis era casi nula como germen indicador de contaminación, hasta que Houston llamó especial atención de que este tipo de estreptococos parecía ser característico de defecaciones animales. Laws & Andrews acreditaron que eran verdaderamente indicativos de contaminación peligrosa una vez que eran aislados en aguas recientemente contaminadas (⁹).

Es importante resaltar la facultad de la *E. coli* de desarrollarse a muy diferentes temperaturas, puede crecer hasta 44° C., y por su resistencia a los antibióticos que se encuentran ocasionalmente en la leche, en estas condiciones las enterobacterias pueden suplantar a las bacterias lácticas e invadir el medio (⁶).

Hunter, citado por Hamer, investigó al respecto sobre *E. coli* y *Aerobacter* en leche a 70° F. (21.1°C.) iban de 1,000 a mil millones en 24 horas y a 60°F. (15.5°C.) las variantes iban de 0 a 10,000. (⁷).

Sobre este punto cabe mencionar que las temperaturas promedio en la ciudad de Guadalajara, a partir del mes de abril

hasta septiembre, oscila entre 21.1 y 23°C. que es la temperatura promedio mayor durante el mes de junio. Este dato es muy importante, ya que, aparte de que la leche pudiera estar contaminada o no, la mayoría de los quesos que se consumen en la ciudad son elaborados en ranchos o pueblos, traídos a la ciudad algunas veces de grandes distancias para su venta, sin tomar en cuenta medidas higiénicas de transporte ni de refrigeración. Los quesos se ponen a exposición para su venta en mesas, mostradores, etc., estando expuestos a contaminaciones por medio del viento y polvo, y a multiplicación bacteriana por la temperatura ambiente.

Además de esto, no todos los quesos son producidos en las plantas lecheras, sino que en ocasiones ésta leche es llevada a otros centros para su elaboración, en ocasiones son grandes distancias, que trae como consecuencia la baja calidad de la leche de quesería y la aparición de numerosas dificultades debidas principalmente a las bacterias coliformes, que con tanta frecuencia y tan abundantemente se encuentran en las leches transportadas (6).

En lo que respecta a estreptococos Moore, hizo un amplio trabajo sobre éstos y las intoxicaciones alimenticias, él afirma que "la falta de certeza acerca de la clasificación de los estreptococos fecalis se refleja en la información inadecuada que se encuentra en la literatura sobre estreptococos y su relación con epidemias de intoxicaciones alimenticias". Del mismo modo Sherman Smiley & Niven Jr., estudiando un estreptococo que había sido responsabilizado por toxicoinfecciones alimenticias contraídas por la ingestión de queso, identificaron al *Streptococo faecalis*, perteneciente al grupo D de Lancefield. (9)

Niven Jr. & White estudiando una colección de 113 cultivos de estreptococos, se aislaron de 100 casos de endocar-

ditis bacteriana sub-aguda, atribuyeron cinco casos a estreptococcus faecalis, que fueron transmitidos probablemente por productos lácteos.

En último análisis, es por lo tanto difícil evaluar la gran contaminación de los alimentos. Para los de origen animal, cuya elaboración envuelve, la mayoría de las veces, manipulación diversa, estando por eso, sujetos a una enorme serie de alteraciones de orden física, química y biológica, es realmente formar idea exacta sobre las condiciones higiénico-sanitarias que necesitarán las diversas fases de preparación de los productos, desde la obtención de la materia prima hasta su manipulación, distribución y momento de consumo. (9).

Según la American Public Health Association, los estreptococos pyogenes, del grupo A de Lancefield, Str. Equisimilis del Grupo C de Lancefield y algunas cepas de enterococos (Streptococcus faecalis), son los únicos estreptococos en productos lácteos que son de importancia desde el punto de vista salud pública. (10).

Los estreptococos pyogenes pueden ser introducidos a la ubre por el manejo humano durante la ordeña. Así también los estreptococos pueden entrar a los productos lácteos por medio de personas infectadas o portadoras que contaminan directamente la leche o los utensilios (10).

Según dispone el punto 3,1 c. de la 1 AVO para la MG. (1) en todos los casos de mamitis la leche no puede sacarse al consumo ni destinarse a otros fines. Esto se hace extensivo a mamitis estreptocócica, si bien, tan sólo cuando la leche presenta signos visibles de alteración. Dentro de nuestros resultados encontramos que hay un 2% de estreptococos agalactie,

un 2% de estreptococos uberis y un 6% de estreptococos dysgalactie, siendo estos tres productores de mastitis cremos que estos quesos pudieron haber sido fabricados a partir de leches mamitosas. (12).

Enfermedades transmitidas por productos lácteos:

Por regla general, las infecciones que pueden transmitirse con los productos lácteos son similares a las que se transmiten con la leche líquida, y se deben normalmente a la leche cruda. La contaminación puede producirse durante la manipulación y elaboración. Estos productos contaminados pueden transportarse y distribuirse a áreas distantes.

La inocuidad de los productos lácteos depende de varios factores, como el contenido de agentes patógenos de la leche con que se los prepare; la contaminación posterior a la preparación; la temperatura de elaboración y almacenamiento; el contenido de ácidos, agua y sal del producto; la contaminación del ambiente, y el tipo de microorganismos de que se trate. Se dispone de poca información sobre el papel de los productos lácteos en la difusión de las infecciones especialmente en los países en desarrollo y en los climas cálidos. (11).

AVO para la MG
Primera Orden para el desarrollo de la Ley de
la Leche C.M.G. de 15.5.1931 en la versión de
19.12.1959 (Baviera).

CONCLUSIONES

- I.—De acuerdo a la Ley sobre producción, tratamiento y venta de leche y sus derivados, en su artículo 8, que se refiere a leche certificada cruda, encontramos en nuestros resultados que sólo un 2% de las muestras trabajadas, reúnen estos requisitos, ya que la mayoría de estos tipos de quesos se elaboran a partir de leche cruda.

- II.—Dentro de la identificación de especies bacterianas encontramos que el género *E. coli* es la de más alto porcentaje 90.4% de las muestras trabajadas. Lo cual muestra el alto grado de contaminación fecal de los quesos por este microorganismo.

- III.—Otro germen que se utiliza para comprobar la calidad higiénica de los alimentos; *Streptococos fecalis*, lo encontramos en un 6% de las muestras trabajadas, lo cual nos sirve para confirmar lo anteriormente descrito en cuanto a contaminación fecal, ya que ambos géneros provienen de heces fecales.

- IV.—Encontramos los tres tipos de gérmenes que más comúnmente producen mastitis: *Str. Agalactie*, *Str. Dysgalactie*, *Str. Uberis*, que nos permite suponer la presencia de leches mamíferas en la elaboración de estos productos.

RESUMEN

Se trabajaron 50 muestras de quesos tipo fresco (panella, requezón y queso propiamente dicho). Se hicieron primeramente diluciones en ocho tubos con agua destilada estéril. Se hizo posteriormente la siembra en agar nutritivo, en Selenite y en Verde Brillante y Gelosa sangre.

Después de 24 horas de incubación se procedió al conteo de colonias en agar nutritivo, a la identificación de cocos en geloso sangre, a la resiembra a partir de selenite en Verde brillante para aislamiento e identificación de enterobacterias.

Si se identificaban cocos se procedía a hacer una tinción de Gram, para diferenciar micrococos de estafilococos se hacía la prueba de la catalaza, enseguida para hacer diferenciación de cocos se procedió a hacer bioquímica de los mismos por medio de azúcares.

En nuestros resultados encontramos de acuerdo a las cuentas bacterianas que un 2% contenía menos de cien mil colonias/c.c., entre cien mil y un millón no encontramos ninguna, un 8% de las muestras entre un millón y cien millones, y, un 90% de más de cien millones.

Estos resultados son atribuibles a la mala calidad de la leche con que se elaboran los quesos, falta de higiene en el manejo, contaminaciones durante su exposición para la venta, etc.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Microbiología de la Leche
Foster, Nelson, Spek, Doetsch, Olson
Pág.
- 2.—Comunicación Verbal
Comisión Técnica de la Leche.
Departamento de Economía del Estado de Jalisco.
Secretaría de Industria y Comercio.
- 3.—Estimación Bacteriana y Aislamiento de Gérmenes Aerobios en Leche no Pasteurizada.
- 4.—Comunicación Verbal.
Comisión Técnica de la Leche.
Secretaría de Salubridad y Asistencia.
- 5.—Decreto No. 5875. Ley sobre Producción, Tratamiento y Venta de Leche y sus Derivados. 355.
En el Estado de Jalisco.
Guadalajara, Martes 3 de Noviembre de 1953. No. 23.
- 6.—Ciencia de la Leche (Principios de técnica lechera)
Charles Alais.
Compañía Editorial Continental, S. A.
1970. Pág. 230-232-261-478-492.
- 7.—Dairy Bacteriology. 4th edition.
1957. (Wiley) Editorial
Bernard W. Hamer, Frederick J. Babel.
- 8.—Boletín de Meteorología No. 1
Plan Lerma
Enero 1966. Pág. 151, 217.
- 9.—Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria de Sao Paulo, Brasil. Volumen 8, fasc. I, 1969.
Contribucao para o Estudo da Incidencia de Germes Dos Grupos Coliforme e Enterococo No Leite em Alguns de Seus Derivados. Págs. 216 - 219.

- 10.—Modern Methods for Inspection in Dairy Products.
American Public Health Association 1970
Pág. 121-167-215-217.
- 11.—Enfermedades Transmitidas por la Leche.
Comité Mixto F.A.O./OMS de Expertos en Higiene de la Leche.
Segundo Informe
Publicado conjuntamente por la FAO y la OMS y reproducido asimismo en OMS.
Serie de Informes Técnicos No. 197. E.A. FAO No. 52
Pág. 30-34.
- 12.—Inspección Veterinaria de la Leche.
Martin Lerche.
Editorial ACRIBIA
Zaragoza (España) 1969
Pág. 131-145.