

Artículo original

Determinación de enterobacterias y detección de genes de virulencia en *Escherichia coli* aislada en leche cruda

Ysheth Millán^a, Ariadna Méndez^b, Marcela Burguera^b, Paula Pimentel^b, María Araque^a, Ana Ramírez^{a,b,*}

^aLaboratorio de Microbiología Molecular. ^bLaboratorio de Microbiología del Suelo, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Recibido 25 de febrero de 2018; aceptado 14 de agosto de 2018

Resumen: Para estudiar la carga patogénica de *Escherichia coli* en la leche cruda procedente del ganado vacuno de la finca “El Renacer”, se realizó la prueba del tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM) y se cuantificaron las enterobacterias mediante el método de recuento en placas. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por la técnica de difusión en disco y los seis genes de virulencia *KpsMIII*, *fimH*, *PAI*, *papAH*, *usp* y *fyuA* fueron estudiados mediante amplificación por PCR. Los resultados de la prueba TRAM califican la leche cruda, de “buena calidad”. El recuento total de colonias fue $1,79 \times 10^5$ UFC/mL, correspondiendo $1,36 \times 10^5$ UFC/mL a enterobacterias y $4,28 \times 10^4$ UFC/mL a otros grupos bacterianos. Las pruebas de susceptibilidad revelaron que todas las cepas analizadas fueron resistentes a la ampicilina. En la cepa de *E. coli* solo se detectó el gen de virulencia *fimH*. En general, los resultados demostraron que es necesario que las autoridades de salud del país implementen medidas de control sanitario en la leche cruda, desde las fincas de ordeño hasta la industria láctea regional.

Palabras clave: *Escherichia coli*; genes de virulencia; leche cruda de vaca; prueba de azul de metileno; enterobacterias.

Determination of enterobacteria and detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from raw milk

Abstract: To study the pathogenic burden of *Escherichia coli* in raw milk from cattle of the “El Renacer” farm, the methylene blue reduction test (MBRT) test was carried out and Enterobacteria were quantified by the plate counting method. Antimicrobial susceptibility was determined by the disc diffusion method and six virulence genes *KpsMIII*, *fimH*, *PAI*, *papAH*, *usp* and *fyuA* were studied by PCR amplification. The results of MBRT qualify raw milk as “good quality”. Total colony count was 1.79×10^5 CFU / mL, corresponding to Enterobacteria 1.36×10^5 CFU/mL and 4.28×10^4 CFU/mL to other bacterial groups. Susceptibility tests revealed that all strains analyzed were resistant to Ampicillin. In the *E. coli* strain only the *fimH* virulence gene was detected. In general, the results showed that it is necessary for the National Health Authorities to establish sanitary control measures for raw milk, from dairy farms to the regional dairy industry.

Keywords: *Escherichia coli*; virulence genes; raw cow’s milk; methylene blue reduction test; enterobacteria.

* Correspondencia:
E-mail: ramirezana@ula.ve

Introducción

La leche es un alimento que proporciona proteínas, calcio y vitaminas A, B, D y E [1,2]. En Venezuela, la norma N° 903 de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) [3] define la leche cruda como el producto íntegro, normal y fresco obtenido del ordeño higiénico e ininterrumpido de vacas sanas. Este producto, desde su síntesis en la glándula mamaria del ganado vacuno hasta su llegada al consumidor, está expuesto a

numerosos riesgos biológicos y físico-químicos que pueden alterar la calidad original, representada esencialmente por la concentración de sus componentes nutricionales, características organolépticas y por un recuento bacteriano bajo [1]. En este sentido, la leche para consumo humano (cruda o pasteurizada) debe estar libre de microorganismos patógenos, sedimentos y materias extrañas o nocivas, además de presentar un conteo bacteriano total bajo, entre otras características [4].

La calidad de la leche cruda está determinada por factores

como: a) los relacionados al manejo y alimentación de los animales, b) la obtención y almacenamiento de la leche recién ordeñada y c) los vinculados a los centros de acopio. Estos factores definirán las características microbiológicas del producto, determinando inclusive su tiempo de vida útil [1]. En Venezuela, son escasos los estudios sobre la calidad sanitaria de la leche cruda [5]; algunos estudios realizados en los estados Carabobo, Zulia, Trujillo y Mérida, reportaron que la calidad higiénica de la leche cruda y pasteurizada fue deficiente con base en las directrices de la norma COVENIN N° 903 [5-7].

Uno de los indicadores importantes para evaluar la calidad sanitaria de un alimento es la detección y cuantificación de *Escherichia coli*, ya que su presencia indica, generalmente, contaminación directa o indirecta de origen fecal, que en algunas ocasiones pudiera estar acompañada de otros patógenos intestinales [8] y que, en el caso de la leche, pudiera ocasionar pérdida en la producción lechera y disminución de su volumen, además de incrementar el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en la población consumidora [4].

Las infecciones causadas por *E. coli* son una importante causa de morbimortalidad en todo el mundo, y la capacidad de estas cepas de causar diferentes tipos de enfermedades está dada por la expresión de distintos factores de virulencia, tales como: adhesina de la fimbria tipo 1 (*fimH*), fimbria P (*papAH*), cápsula polisacárida específica del grupo II (*KpsMt II*), proteína específica uropatógena (*usp*), sideróforo yersineabactina (*fyuA*), entre otros. Muchos de los genes de virulencia en *E. coli* se localizan en islas de patogenicidad (PAI) [9].

Por otra parte, es importante señalar que el hombre es un ecosistema ideal para la transferencia, no solo de genes de resistencia sino también de distintos factores de virulencia que modifican la carga genética de estas bacterias, convirtiéndolas en potencialmente patógenas y resistentes a los antibióticos [8,10], de tal forma que es necesario vigilar el perfil genético de *E. coli* aislada de alimentos. En este sentido y en virtud de que esa carga patogénica en cepas de *E. coli* aisladas de la leche cruda no ha sido descrita en el país, en el presente estudio, además de determinar el recuento de enterobacterias, se realizó la detección de genes de virulencia y se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli* aislada en la leche cruda procedente del ganado vacuno de la finca “El Renacer”.

Materiales y métodos

Origen y características de la muestra: Se analizó la leche cruda proveniente de vacas “Jersey”, clínicamente sanas, criadas bajo el sistema de producción de la hacienda familiar denominada ‘El Renacer’, ubicada en el municipio Alberto Adriani del estado Mérida. El proceso de ordeño se realizó de forma mecánica, dos veces al día (matutino y vespertino). La leche obtenida (aproximadamente 136 L/día) se vació en un tanque refrigerado a 8 °C, donde se mantuvo hasta el momento de su traslado a la fábrica de

quesos pasteurizados.

Recolección de las muestras de leche cruda de vaca: A partir del tanque de almacenamiento refrigerado que contiene el ordeño matutino y vespertino, se recolectaron un total de 3 muestras de leche cruda, de un litro cada una, en envases estériles. Las muestras fueron transportadas al laboratorio bajo condiciones de refrigeración (6-8 °C) y analizadas dentro de las 24 h posteriores a la recolección.

Medios de cultivos: Los medios de cultivo agar eosina azul de metileno o Levine (EMB, por sus siglas en inglés; BBL Becton, Dickinson USA) y agar soya tripticasa (ATS, por sus siglas en inglés; HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Mumbai, India) fueron preparados siguiendo las indicaciones del fabricante. Ambos medios fueron sometidos a controles de esterilidad y desarrollo bacteriano utilizando las cepas controles: *E. coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Prueba de tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM): Se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la norma COVENIN N° 939, brevemente: a tubos de ensayo estériles se agregó 10 mL de leche cruda y 1 mL de solución de azul de metileno al 4%, se mezcló por inversión 3 veces y se incubaron en baño de María a 37 °C. Las primeras 3 lecturas se realizaron cada 30 min y luego cada hora hasta un máximo de 5 h. Cada muestra se procesó por triplicado. La prueba TRAM se interpretó de acuerdo a los criterios de García y col. (s/f) y la norma COVENIN N° 939 [11,12].

Determinación de enterobacterias: Se llevó a cabo utilizando el método de recuento en placas mediante la siembra en agar EMB. Para ello, se prepararon diluciones decimales sucesivas hasta 10⁻⁸ de leche en agua peptonada estéril; de cada una de ellas se sembraron 100 µL en los medios de cultivos, este procedimiento se realizó por triplicado utilizando la técnica de extensión en superficie y se incubó a 37 °C hasta por 72 h. Las placas fueron revisadas diariamente y la lectura se realizó en aquellas diluciones que tenían un recuento entre 30-300 colonias. El número promedio de colonias en las tres placas de una misma dilución se multiplicó por la dilución correspondiente y el volumen del inóculo para obtener el recuento total de las mismas, el cual se expresó en unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) [5,13]. Igualmente se realizó el conteo por separado de cada morfotipo de colonia y se calculó de la misma manera.

Aislamiento e identificación bacteriana: Luego del periodo de incubación se procedió a revisar las placas y se seleccionaron 5 colonias por cada morfotipo fermentador de la lactosa (color azulado-negro), con o sin brillo metálico en agar EMB y se subcultivaron en ATS para verificar la pureza de las mismas. A partir de este crecimiento se realizó la tinción de Gram y la identificación mediante el sistema de galerías API®20E (BioMerièux, Marcy l’Etoile, Francia),

siguiendo las indicaciones del fabricante. Como cepa control se utilizó *E. coli* ATCC 25922. Fueron excluidos para la identificación los cocos grampositivos y los bacilos gramnegativos no fermentadores de la lactosa (colonias incoloras en el agar EMB) que resultaron positivos en la prueba de la oxidasa, debido a que este grupo de microorganismos no forman parte del objetivo del estudio.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: Las pruebas de susceptibilidad se realizaron a un clon seleccionado al azar de cada cepa identificada como *Enterobacteriaceae*, utilizando el método de difusión por disco, de acuerdo con los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [14]. Los discos de antibióticos (BBL) utilizados fueron: ampicilina (10 µg), amoxicilina/ácido clavulánico (30/15 µg), ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), gentamicina (10 µg), amikacina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), ácido nalidixico (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ertapenem (10 µg) y aztreonam (30 µg). En estos ensayos se utilizó como cepa control *E. coli* ATCC 25922.

Extracción del ADN genómico: La extracción del ADN genómico solo se realizó a la cepa de *E. coli* utilizada en las pruebas de susceptibilidad. A partir de un cultivo puro de 18 h de incubación, se transfirieron 10 colonias y se suspendieron en 200 µL de agua destilada estéril. Esta suspensión se sometió a ebullición durante 15 min. Los residuos celulares se separaron por centrifugación (13.000 revoluciones por minuto durante 5 min a temperatura ambiente) y el ADN, disuelto en el sobrenadante, se recuperó en un tubo Eppendorf estéril y se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso [15].

Detección de genes de virulencia: La amplificación de los genes *kpsMTII*, *fimH* y PAI se realizó mediante una PCR múltiple y los genes *papAH*, *usp* y *fyuA* por PCR simple, utilizando los iniciadores y las condiciones de amplificación descritos previamente [15]. Las cepas control utilizadas en estos ensayos fueron *E. coli* LMM/E02-ULA (*fimH* +, *fyuA* +, *kpsMTII* + y PAI +), *E. coli* LMM/Sc03-ULA (*papAH* +) y *E. coli* LMM/E02-ULA (*usp* +).

Resultados

Al realizar la prueba TRAM en las muestras de leche cruda, el tiempo de decoloración fue de 5 horas, por lo que de acuerdo al criterio de García y col. (s.f.) la leche del ganado vacuno de la Hacienda “El Renacer” presentó una calidad microbiológica buena correspondiente a una estimación del número de bacterias totales que oscila en un rango de 100.000 y 200.000 UFC/mL, mientras que de acuerdo a la Norma COVENIN 903 [3], las muestras analizadas se clasificaron como clase I.

En la tabla 1 se muestran los recuentos totales de bacterias obtenidos y en la tabla 2 se detalla el conteo de las especies de enterobacterias y otros grupos bacterianos (cocos grampositivos y bacilos gramnegativos no fermentadores

Tabla 1. Recuento de bacterias totales en leche cruda, en la hacienda “El Renacer”. Municipio Alberto Adriani, estado Mérida.

Muestras	Nº promedio de las colonias por dilución*				Recuento promedio* (UFC/mL)
	≤10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
1	I	>300	172	≤30	1,7 x 10 ⁵
2	I	>300	185	≤30	1,9 x 10 ⁵
3	I	>300	180	≤30	1,8 x 10 ⁵
Promedio total					1,8x10 ⁵

I = incontables, *Correspondiente al promedio de las 3 réplicas por muestra. A partir de 10⁻⁶ hasta 10⁻⁸ no hubo crecimiento bacteriano. El número promedio de colonias en las tres placas de una misma dilución se multiplicó por la dilución correspondiente y el volumen del inóculo para obtener el recuento total de las mismas.

Tabla 2. Recuento de cada grupo bacteriano en leche cruda, en la hacienda “El Renacer”. Municipio Alberto Adriani, estado Mérida.

Tipos de bacterias	Promedio del recuento (UFC/mL)	Identificación
		<i>Escherichia coli</i> (7,5x10 ⁴ UFC/mL)
Enterobacterias	1,4x10 ⁵	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3,7x10 ⁴ UFC/mL) <i>Enterobacter</i> spp. (2,4x10 ⁴ UFC/mL)
Cocos grampositivos	6,8x10 ³	-
BGNMF (oxidasa +)	3,6x10 ⁴	-
Total	1,8x10 ⁵	-

BGNMF: bacilos gramnegativos no fermentadores de la lactosa.

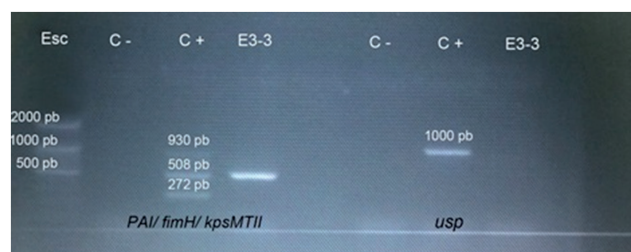


Figura 1. PCRs múltiple y simple para determinar los genes de virulencia PAI, *fimH*, *KpsMTII* y *usp*. Esc: Marcador de peso molecular de 100 pb, C-: control negativo, C+: control positivo, E3-3: *E. coli* analizada, pb: pares de bases. PAI: marcador de isla de patogenicidad ICFT07, *fimH*: adhesina de la fimbria tipo I, *KpsMTII*: cápsula polisacárida específica del grupo II, *usp*: proteína específica uropatógena.

de la lactosa, oxidasa positivos). El recuento total de las enterobacterias (1,4 x 10⁵ UFC/mL) superó a los otros grupos bacterianos (4,3 x 10⁴ UFC/mL), siendo *E. coli* la especie de enterobacterias que representó el mayor porcentaje (42%) de los aislamientos.

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana realizadas en las cepas de enterobacterias

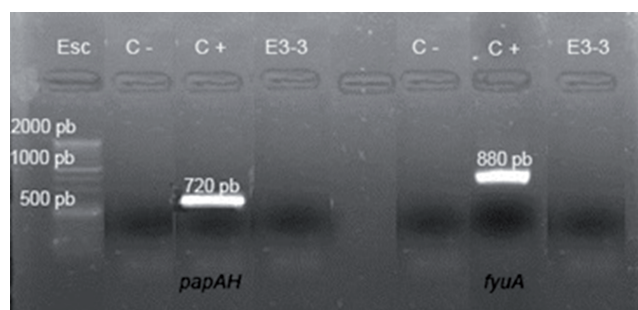


Figura 2. PCRs simples para determinar los genes de virulencia *papAH* y *fyuA*. Esc: Marcador de peso molecular de 100 pb, C-: control negativo, C+: control positivo, E3-3: *E.coli* analizada, pb: pares de bases. *papAH*: fimbria P, *fyuA*: yersiniabactina.

Tabla 3. Susceptibilidad a los antibióticos de cepas aisladas en leche cruda, en la hacienda “El Renacer”. Municipio Alberto Adriani, estado Mérida.

Antibióticos	Cepas		
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Enterobacter</i> sp.
Ampicilina (10 µg)	R	NR	NR
Amoxicilina/ ácido clavulánico (30/15 µg)	S	S	NR
Ceftazidima (30 µg)	S	S	S
Cefotaxima (30 µg)	S	S	S
Imipenem (10 µg)	S	S	S
Meropenem (10 µg)	S	S	S
Ertapenem (10 µg)	S	S	S
Aztreonam (30 µg)	S	S	S
Gentamicina (10 µg)	S	S	S
Amikacina (30 µg)	S	S	S
Ciprofloxacina (5 µg)	S	S	S
Ácido nalidixico (30 µg)	S	S	S

NR: naturalmente resistente, S: sensible, R: resistente.

identificadas, revelaron que todas fueron sensibles a los 12 antibióticos probados, exceptuando a *E. coli* que mostró resistencia a ampicilina (Tabla 3).

En la figura 1 se muestran los resultados de la PCR múltiple (PAI, *fimH*, *KpsMTII* y *usp*), de los cuales se detectó solo el gen *fimH*, mientras que la figura 2 corresponde a los resultados de las PCRs simples en la cual se puede evidenciar que la cepa en estudio de *E. coli* no posee los genes de virulencia *papAH* y *fyuA*.

Discusión

En la leche cruda, obtenida del ganado vacuno de la hacienda “El Renacer”, no se realizan estudios microbiológicos, la determinación de la carga bacteriana se investiga solo indirectamente a través de la prueba TRAM.

De tal manera que a este producto no se le realizan de rutina recuentos bacterianos que permitan establecer si la calidad microbiológica se ajusta a los estándares establecidos en las normativas vigentes. En este estudio se detectó la presencia de enterobacterias (conforman los coliformes totales) en el mencionado producto lácteo; según la norma COVENIN N° 903, la presencia de estos microorganismos está relacionada con la calidad de la leche cruda [3]. Cabe destacar que el 100% de la producción de esta finca es recibida por la industria para la elaboración de quesos pasteurizados, razón por la cual debe mantener una alta calidad química y microbiológica, por consiguiente debe tener recuento bacteriano ajustado a los estándares establecidos en las normativas vigentes.

Los resultados de la prueba del TRAM indicaron que las muestras analizadas en este estudio se clasificaron como clase I, es decir, este producto es considerado de buena calidad. En un estudio previo realizado en el estado Carabobo (Venezuela) se reportó que el 30% de las muestras de leche cruda fueron catalogadas como clase I de acuerdo al método TRAM, por lo tanto, un porcentaje bajo cumplió con los estándares de calidad [5].

Por otra parte, el recuento de enterobacterias obtenidos en este estudio fue de $1,4 \times 10^5$ UFC/mL; la normativa COVENIN N° 903 [3] no establece el valor máximo para estos microorganismos, se limita a bacterias aeróbicas mesófilas (BAM). Sin embargo, Enamorado en Honduras y Celis y Juárez en Argentina describen que los valores de referencia de los coliformes para la leche cruda son de 1.000 a 10.000 UFC/mL [2,16], de tal manera que la leche obtenida del ganado de la finca “El Renacer” excede dicho valor en aproximadamente 130 veces, catalogándola como un producto no apto para el consumo desde el punto de vista microbiológico. Se ha estimado que más de 95% de las causas que generan un incremento de la carga bacteriana en la leche cruda son las deficiencias en el lavado, higiene y saneamiento de equipos y utensilios de ordeño, o están asociadas a problemas en el enfriamiento del producto recién ordeñado [1]. Es probable, que los resultados del análisis microbiológico de la leche cruda reflejen inconvenientes en los puntos críticos del manejo de este tipo de producto.

El recuento de enterobacterias obtenido en este estudio ($1,4 \times 10^5$ UFC/mL) fue similar a los valores reportados para coliformes totales en investigaciones en Marruecos ($4,1 \times 10^5$ UFC/mL) [17] y en la India ($1,0 \times 10^5$ UFC/mL) [18], pero estos resultados son superiores a los obtenidos en estudios realizados en Bolivia ($7,9 \times 10^4$ UFC/mL), Argentina ($5,25 \times 10^2$ UFC/mL), Colombia ($4,6 \times 10^3$ UFC/mL) e Irán ($1,3 \times 10^3$ UFC/mL) [4,19-21]. Cabe destacar que los resultados mencionados anteriormente fueron superiores a los valores de referencia establecidos en las normas sobre la calidad higiénica de la leche que se aplican en cada uno de estos países.

E. coli es una bacteria que se encuentra comúnmente en el sistema digestivo de los seres humanos y animales, por lo tanto esta bacteria se utiliza como el indicador principal para detectar y medir la contaminación fecal en

la evaluación de la inocuidad del agua y de los alimentos [8,22]. En el presente estudio el recuento de *E. coli* fue de $7,5 \times 10^4$ UFC/mL, valor que es superior al reportado en un estudio realizado en Túnez en leche cruda, que osciló entre $1,2 \times 10^2$ y $4,9 \times 10^3$ UFC/mL [21]. Ambos resultados revelan la necesidad de intensificar los controles higiénicos sanitarios en todas las etapas de obtención de la leche.

Es importante destacar que algunas *E. coli* pueden causar patologías en el ser humano y/o producir alteraciones de la leche o de los subproductos ocasionando un impacto económico y social [1,4]. Se estima que cada año se enferman en el mundo unos 600 millones de personas -casi 1 de cada 10 habitantes- por ingerir alimentos contaminados y que 420.000 mueren por esta misma causa [23]. De tal manera que, la inocuidad y la calidad de los alimentos son características imprescindibles para la seguridad alimentaria, la salud pública y el desarrollo económico de la población [4].

En otro orden de ideas, al relacionar el número de bacterias estimadas mediante la prueba TRAM con el recuento de bacterias obtenidas en el agar EMB, se pudo observar que hubo una correlación entre ambos valores, según los criterios de García y col. (s/f) [11]; sin embargo, estos resultados difieren de los reportados por otros autores [5,24] quienes no encontraron correlación entre ambas metodologías y consideran que la prueba TRAM no es confiable como método rápido de análisis microbiológico de la leche cruda. Esta diferencia puede deberse a que en el presente estudio no se incluyó el recuento total de BAM, de tal manera que no se determinó la carga bacteriana total presente en la muestra, sino una fracción, la correspondiente a las enterobacterias.

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad revelaron que la cepa de *E. coli* analizada fue resistente solo a la ampicilina, este resultado difiere con lo reportado por Guillen y col. [8] quienes indican que 11,1% (5/45) de las cepas de *E. coli* aisladas de derivados lácteos presentaron fenotipos de multiresistencia cuyo perfil de asociación fue ciprofloxacina + ampicilina, por otro lado Darehabi *et al.* [25] reportan que el 30% de las cepas de *E. coli* provenientes de leche cruda y productos lácteos no pasteurizados presentaron un patrón de resistencia conformado por la asociación de ampicilina, cefalotina y aminoglucósidos. Los estudios citados anteriormente indican que es importante implementar medidas de vigilancia epidemiológica para detectar cambios en los patrones de susceptibilidad de *E. coli* presentes en leche cruda.

Aun cuando de los seis genes de virulencia investigados solo el gen *fimH* resultó positivo, esto es relevante ya que el mismo codifica para la fimbria tipo 1, la cual es un factor de virulencia esencial en la colonización e invasión del epitelio urinario, específicamente la vejiga [26-28]. Por otra parte, investigaciones previas han sugerido que el reservorio de cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) es la microbiota intestinal, lo cual fue evaluado por Starcic y Zgur-Bertok quienes concluyeron que las cepas potenciales de ExPEC están presentes entre los aislados fecales de

individuos sanos con una prevalencia $\geq 10\%$ [29]. En tal sentido, se debe considerar que *E. coli* contenida en la leche cruda puede colonizar el intestino del consumidor y con ayuda de una plataforma genética eficiente puede transferir genes de virulencia y de resistencia antimicrobiana.

Conclusiones y recomendaciones

La leche proveniente del ganado vacuno de la finca “El Renacer” contiene *E. coli*, un indicador de contaminación fecal, dicha cepa contiene el gen *fimH* y es resistente a la ampicilina. En general, los resultados demostraron que es necesario que las autoridades de salud del país implementen medidas de control sanitario, desde las fincas de ordeño hasta la industria láctea regional. Por lo tanto, es importante realizar regularmente estudios de la calidad sanitaria de la leche cruda, así como la implementación de medidas que permitan la vigilancia epidemiológica de cepas bacterianas potencialmente patógenas presentes en los productos lácteos.

Conflicto de interés

Los autores declaramos no tener ningún conflicto.

Referencias

- González G, Molina B, Coca R. Calidad de la leche cruda. Primer foro sobre ganadería lechera de la zona de Veracruz. (2010). Disponible en: https://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/CALIDADDELALECHECRUDA.pdf. Acceso 22 de abril 2016.
- Enamorado C. Evaluación microbiológica de la leche cruda recibida y de la línea de procesamiento de la leche fluida en bolsa al 2% de grasa en la planta de lácteos de Zamorano. (2003). Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1881/1/AGI-2003-T012.pdf>. Acceso 03 de noviembre 2014.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN 903-93: Leche cruda. Caracas-Venezuela: Fondonorma; 1993. Disponible en: <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/903-93.pdf> Acceso 13 de abril 2016.
- Mariscal P, Ibáñez R, Gutiérrez M. Características Microbiológicas de Leche Cruda de Vaca en Mercados de Abasto de Trinidad Bolivia. (2013). En: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2307-96062013000200002&script=sci_arttext Acceso 01 de abril 2016.
- Luigi T, Rojas L, Valbuena O. Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada expendida en el estado Carabobo, Venezuela. *Salus*. 2013; 17:25-33.
- Valbuena E, Castro G, Lima K, Acosta W, Bríñez W, Tovar A. Calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizada distribuidas en la ciudad

- de Maracaibo, Venezuela. Revista Científica FCV-LUZ. 2004; 14:59-67.
7. Román S, Guerrero L, Pacheco L. Evaluación de la calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria de la leche cruda almacenada en frío. Revista Científica FCV-LUZ. 2003; 13:146-52.
 8. Guillen L, Millán B, Araque M. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. Infectio. 2014; 18:100-8
 9. Pitout J. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. Front Microbiol. 2012; 3:1-7.
 10. Da Costa PM, Loureiro L, Matos AJF. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The interface between humans, animals and the environment. Int J Environ Res Public Health. 2013; 10:278-94.
 11. García E, Fuentes A, Fernández I. Determinación de la calidad higiénica de la leche mediante la medición indirecta del tiempo de reducción del azul de metileno o prueba de la reductasa microbiana. (s/f). Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/38380/Eva%20Gar%C3%ADa.%20Calidad%20leche-2014.pdf?sequence=1>. Acceso 02 de marzo 2016.
 12. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 939-76. Leche y productos derivados. Método de ensayo, reducción del azul de metileno. Caracas-Venezuela: Fondonorma; 1976. En: <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/939-76.pdf>. Acceso 13 de abril 2016.
 13. American Public Health Association (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3th edition. Washington, USA: American Public Health Association; 1998.
 14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 26th informational supplement M 100. Wayne PA, USA: CLSI; 2017.
 15. Millán Y, Hernández E, Millán B, Araque M. Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. Rev Argent Microbiol. 2014; 46:175-81. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70069-0](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70069-0).
 16. Celis M, Juárez D. Microbiología de la leche. En: Seminario de procesos fundamentales físico-químicos y microbiológicos. Argentina: Editorial Edutecne; 2009 p. 12-7. Disponible en: http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_micrb_09/microbiologia_leche.pdf. Acceso 04 de noviembre 2014.
 17. Srairi M, Moudnib J, Rahho L, Hamama A. How do milking conditions affect the hygienic quality of raw milk? Case study from Moroccan dairy farms. Liv Res Rural Develop. 2006; 18 (Article 97). En:<http://www.lrrd.org/lrrd18/7/srai18097.htm>.
 18. Chatterjee SN, Bhattacharjee I, Chatterjee SK, Chandra G. Microbiological examination of milk in tarakeswar, India with special reference to coliforms. Afr J Biotechnol. 2006; 5:1383-5.
 19. Lancelle M, Vasek O. Calidad microbiológica de la leche cruda usada en quesería de la provincia de corrientes. Argentina. 2002. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2002/08-Exactas/E-008.pdf>. Acceso 22 de abril 2016.
 20. Calderón A, García F, Martínez G. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. Rev MVZ Córdoba. 2006; 11:725-37.
 21. Balí O, Lajnef R, Feifoul I, Attia H, Ayadi M. Detección de *Escherichia coli* in unpasteurized raw milk. IJAFS. 2013; 3:53-5.
 22. Food and agriculture organization of the united Nations (FAO). Prevención de la *Escherichia coli* en los alimentos. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf. Acceso 01 de agosto 2017.
 23. Organización Mundial de la Salud (OMS). Inocuidad de los alimentos. (2015). En: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es>. Acceso 01 de Agosto 2017.
 24. Burdova O, Baranova M, laukova A, Rozanska H, Rola J. Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. Bull Vet Inst Pulawy. 2002; 46:325-9.
 25. Darehabi HK, Naseri MH, Menbari S, Mobaleghi J, Kalantar E. Antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli* groups A, B1,B2 and D isolated from frozen foods and children with diarrheain Sanandaj, Iran. Int J Enteropathog. 2013; 1:1-4.
 26. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. Inter J Nephro. 2012; Article ID 681473. doi: 10.1155/2012/681473.
 27. Martínez J, Mulvey A, Schilling J, Pinkner J, Hultgren S. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. EMBO J. 2000; 19:2803-12.
 28. Mulvey M. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. Cell Microbiol. 2002; 4:257-71.
 29. Starcic M, Zgur-Bertok D. Virulence potential for extraintestinal infections among commensal *Escherichia coli* isolated from healthy humans - the Trojan horse within our gut. FEMS Microbiol Lett. 2015; 362:1-9. doi: 10.1093/femsle/fnu061.