

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN – LEÓN
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA**



TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE: Médico Veterinario

TEMA: Valoración de la calidad de la leche procedente del centro de acopio “Esmilda Rizos” en el Municipio de El Sauce departamento de León durante el periodo Marzo 2014 - Mayo 2014

AUTORAS: Br. Rivera Valle Tania Angélica
Br. Vega Montoya Celia Ileana

TUTOR: Dr. Manuel Velásquez Tiffer

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”

A Dios.

Por habernos permitido llegar hasta este punto y habernos dado salud para lograr nuestros objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis abuelos.

Francisco Valle y Ángela Vargas. Por su enseñanza, por los mensajes de alientos y su excelente manera de instruirme para afrontar la vida. En este reto universitario fueron igualmente concluyente, no lo hubiera podido haber hecho sin su apoyo incondicional.

A nuestros familiares.

Por ser el pilar fundamental en todo lo que somos, en toda nuestra educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A nuestro tutor

Dr. Manuel Tiffer por habernos orientado correctamente para realizar un excelente trabajo.

A nuestros maestros.

Por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis.

A nuestros amigos.

Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos, , aquellos que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario, y que nos ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis...

Al padre de mi hijo

Dr. Miguel Angel Montalvan Valverde el cual sin su apoyo y tolerancia no hubiese podido culminar nuestra tesis.

INDICE

CAP		PAGINA
I	Introducción.....	1
II	Justificación.....	3
III	Antecedentes.....	4
IV	Objetivo General.....	5
	Objetivos específicos.....	5
V	Marco teórico.....	6
	Factores que afectan la composición y la calidad de la leche.....	9
	Formas de contaminación de la leche.....	13
	Características organolépticas de la leche.....	17
	Calidad microbiológica de la leche.....	18
	Métodos de ensayos rápidos de detección de microorganismos en la leche.....	19
	Características de los microorganismos en la leche más comunes.....	24
VI	Diseño metodológico.....	26
	Materiales y métodos.....	27
	Procedimiento.....	28
VII	Resultados y análisis de los resultados.....	36
IX	Conclusiones.....	41
X	Recomendaciones.....	42
XI	Bibliografía	43
XII	Anexos.....	45

I. INTRODUCCION

Leche (Del latin. lac, lactis) según la Real Academia Española la define como líquido blanco que segregan las mamas de las hembras de los mamíferos para alimento de sus crías.

La leche entera cruda es el producto no alterado no adulterado del ordeño higiénico e ininterrumpido de vacas sanas que no contengan calostro y que esté exento de color, olor, sabor y consistencias anormales. ¹ (NTON 03-027-99)

La leche cruda está compuesta por un 87% de agua y una parte solida de 12.7%. La leche cruda favorece al crecimiento de medios de cultivos para el crecimiento de microorganismos banales y patógenos, por eso es fundamental mantenerla en optima condiciones higiénicas.

El objetivo de este trabajo investigativo fue relacionar el estado Microbiológico, las características fisicoquímicas de la leche entera cruda y su relación con el estado higiénico sanitario de las fincas, que abastecen de este producto al centro de acopio “**Doña Esmilda**” en el municipio de El Sauce departamento de León . Se seleccionaron cinco fincas de las cuales se recolectaron 45 muestras, realizando muestreo una vez por semana, durante tres semanas , equivalente a nueve muestras por fincas, de las comarcas: Los Tololos, San José, Panales I, La Esperanza, El Cinco,

Es importante tener presente que la calidad microbiana de la leche debe ser vista bajo tres aspectos fundamental: sanitaria, ya que puede resultar en un vehículo de trasmisión de enfermedades zoonoticas, tecnológico y económico. El origen de la contaminación microbiana de la leche puede provenir tanto de la ubre como del medio ambiente y tipo de ordeño. El objetivo del análisis Microbiológico de la leche cruda es determinar si la leche cruda es apta o no para el procesamiento y consumo humano.

La leche cruda del centro de Acopio Esmilda Rizo, presenta carga de agentes patógenos por: la falta de procesamiento industrial (pasteurización), lo cual puede incurrir en problema de salud para los consumidores.

Se analizaron las condiciones de manejo de la leche durante el ordeño, los medios de transporte al centro de acopio así como el tiempo de traslado como factores influyentes en la calidad de la leche.

II JUSTIFICACION

La leche destinada al consumo de la población debe reunir características de calidad bacteriológica que se enmarquen dentro de parámetros establecidos por la normativa vigente. Aun así, se expende leche cruda directamente al consumidor, sin que medie un sistema de control sanitario, realizado por instituciones que son responsables de precautelar la salud pública y la inocuidad de los alimentos de origen animal. De este modo, la población queda expuesta a contraer enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs). Las ETAs provocan, todos los años, numerosas afecciones y fallecimientos, además afectan negativamente en la economía, tanto en países en desarrollo como en desarrollados.

Es importante manifestar que a través de la leche cruda se puede transmitir un gran número de enfermedades causadas por virus o bacterias, como ser: Carbunco, shigelosis, cólera, difteria, fiebre tifoidea y paratifoidea. También salmonelosis, estreptocócicas, adenovirus, hepatitis infecciosa, fiebre Q, encefalitis transmitidas por las garrapatas, botulismo, gastroenteritis enterotóxica estafilocócica, infección por clostridium perfringens (Welchii) e infección por gérmenes coliformes.

En Nicaragua existe la tradición de consumir leche directa sin un proceso de pasteurización, aunque en muchos hogares se someta a procesos térmicos (cocción) y en algunos casos incompleto (solo un breve calentamiento) estos procesos no son garante de la inocuidad debido a que una vez cocida la leche hay que esperar su enfriado y esto se realiza a temperaturas ambiente permitiendo la sobre vivencia de microorganismos patógenos termo resistentes. Los productos lácteos como el queso, crema, mantequilla elaborados de manera artesanal con leche no pasteurizada establecen un gran riesgo para la salud del consumidor. A esto se suman los hábitos inadecuados durante el ordeño y transporte de la misa.

III ANTECEDENTES

En un estudio realizado en Bolivia sobre las características microbiológica de la leche cruda abastecida en mercados arrojaron los siguientes resultados .El 64,3% de las muestras de leche se clasificaron como leche clase uno (<100.000 ufc/ml BMA). El 35,7% clase dos (101.000 a 300.000 ufc/ml Bacterias Mesofilas Aerobias). De acuerdo al recuento de Organismos Coliformes, el 100% de las muestras presentaron valores por encima del valor aceptado.² Mariscal.et al.

En un estudio realizado en Zamorano Honduras en el 2003, sobre la calidad microbiológico de leche a la Asociación de Ganaderos de Zamorano (AGAZA). Se obtuvieron los siguientes resultados:

“Los conteos microbiológicos promedios de la leche proveída por AGAZA mostraron estar sobre el límite máximo permitido tanto para mesófilos aeróbicos y E. coli, lo que indica que esta leche no fue manejada adecuadamente; ya que E. coli es un indicador claro de exposición a material fecal atribuido principalmente a un mal manejo de la leche antes y durante la llegada a la planta. Los coliformes totales se mantuvieron dentro de los valores de referencia. Así mismo, la leche proveída por AGAZA se clasificó de acuerdo a su recuento promedio de mesófilos aeróbicos como leche grado C”²

Muestras de leche proveniente del productor AGASA	Valor de referencia	Media	Coefficiente de Varianza
MICROORGANISMOS			
Mesófilos aeróbicos (UFC/ml)	1 x 10 ⁶	1.12 x 10 ⁷	128.91
Coliformes totales (UFC/ml)	1 x 10 ⁶	5.19 x 10 ⁵	197.52
E. coli (UFC/ml)	Ausencia	2.5 x 10 ⁴	147.80
CONDICIONES			
Temperatura (°C)	Z 4	10.75	40.41
Tiempo (minutos)	Z 60	55.88	25.29

III OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Valorar la calidad de la leche cruda del centro de acopio “Esmilda Rizos” en el Municipio de El Sauce departamento de León.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la carga bacteriana en leche cruda procedente del centro de acopio Esmilda Rizos de acuerdo a la norma técnica obligatoria nicaragüense NTON 03-027-99

Evaluar y determinar el estado higiénico sanitario de las salas de ordeños y la calidad de la leche cruda de las fincas que abastecen el centro de acopio Esmilda Rizo de acuerdo a la norma técnica nicaragüense NTON 03-027-99

Evaluar la sensibilidad de los microorganismos presentes en la leche cruda por el método en disco

IV.MARCO TEORICO

LECHE

Según Valdez Pérez (1999) en el primer congreso internacional para la represión de los fraudes celebrado en Ginebra en 1980, se acordó de la siguiente definición. La Leche es el producto integrado del ordeño completo e ininterrumpido de una hembra sana, bien alimentada y no fatigada, recogida higiénicamente y no debe contener calostro. En cuanto a su composición la leche de vaca es considerada uno de los componentes más importantes por su gran valor económico y por estar sujetos a mayores variaciones, pudiendo ser afectada por un gran número de factores agrupados como: genéticos, fisiológicos y de manejo³

En Nicaragua se rigen bajo la NTON 03-027-99 la cual describe la leche como: el producto de la secreción normal de la glándula mamaria de los animales bovinos sanos, obtenida por ordeño diario higiénico ininterrumpido.

La leche cruda es un líquido de color blanco y olor peculiar, sabor propio que se obtiene del ordeño higiénico y completo de la ubre de las vacas sanas que cumplen con las características físico químico y bacteriológico establecido.

Desde el punto de vista fisicoquímico la leche cruda es una mezcla homogénea de un gran número de sustancias como la lactosa, glicéridos, proteínas, sales, vitaminas, enzimas etc. Algunas están en emulsión como las grasas y las sustancias asociadas, otras en suspensión como la caseína ligada a sales minerales y otras en disolución verdaderas como la lactosa, vitamina, proteínas del suero, sales etc.

La leche cruda está compuesta por un 87% de agua y una parte solida de 12.7%. Esta proporción de solidos totales varía según la raza, el tipo de alimento consumido, entre otros factores. Los sólidos se encuentran divididos en solidos

no grasos que son las proteínas, lactosa, sales minerales y vitaminas, los cuales representan el 8.8% y los sólidos grasos el 3.9% de esta proporción

La leche cruda favorece al crecimiento de medios de cultivos para el crecimiento de microorganismos banales y patógenos, por eso es fundamental mantenerla en optima condiciones higiénicas, libre de contaminaciones microbianas y así poder disminuir en lo posible el riesgo de provocar trastornos de la salud tratando que llegue al consumidor exenta de sustancias nocivas y sin adulteraciones y así garantizar la seguridad de todos aquellos que la consumen.

Tabla N°1- Componentes de la leche cruda de diferentes razas de bovinos lecheros:

Raza	Grasa	Proteína	Lactosa	Cenizas	Sng*	St**
Ayrshire	4.00	3.53	4.67	0.68	8.90	12.90
Guernsey	4.95	3.91	4.93	0.74	9.40	14.61
Holstein F.	3.40	3.32	4.87	0.68	8.86	12.26
Jersey	5.37	3.92	4.93	0.71	9.54	14.91
Suizo Pardo	4.01	3.61	5.04	0.73	9.40	12.41

* Solidos no grasa

** Solidos totales

Vitaminas	Cantidad mg/g
A	340,0
D	0.6
Tiamina	420,0
Riboflabina	1.570,0
Ácido Nicotínico	850,0
Ácido Ascórbico	16,0

Elementos	Porcentaje
Sodio	0,58
Potasio	1,38
Cloro	1,03
Calcio	1,25
Magnesio	0,12
Fosforo	1,00
Hierro	0,001
Azufre	0,300

Las características más importantes de la leche son su variabilidad, alterabilidad y complejidad. En cuanto a la variabilidad, desde el punto de vista de la composición, no es posible hablar de una leche sino de leches debido a las diferencias naturales entre especies o para una misma especie según la región o lugar de origen.

Con relación a la complejidad, ésta se debe a las moléculas que se encuentran en equilibrio químico, como por ejemplo el fosfocaseínato de calcio o el sistema del glóbulo graso.

El componente de la leche que presenta mayor variabilidad es la grasa. También, esta variación puede ser observada entre vacas de la misma raza que reciben distinta alimentación. En este particular, el factor que más interfiere en el porcentaje de grasa en la leche es la concentración de la fibra en la dieta o la relación forraje/concentrado. Así, cuanto mayor es la concentración de fibra, mayor es la de la grasa en la leche debido, a la proporción de ácidos grasos

Tabla Nº 2 Leche entera cruda características físico-químicas (NTON 03-027-99)

Requisitos	Mínimo	Máximo
Densidad a 15 °C (Gravedad específica)	1.0300	1.0330
Materia Grasa % m/m	3.0	-
Sólidos Totales % m/m	11.3	-
Sólidos no grasos % m/m	8.3	-
Acidez expresada como ácido láctico % (m/v)	0.13	0.16
pH	6.6	6.7
Ensayo de reductasa (azul de metileno), en horas		-
Leche para consumo directo	6.5	7.0
Leche para pasteurización	4.0	
Impureza macroscópicas (sedimentos) (mg/500 cm³norma o disco)	-	4.0
Índice criocópico (para recibos individuales por fincas)	- 0.530 °C (-0.550 °H)	- 0.510 °C (-0.530 °H)
Índice de refracción	$n_{20}^{D} 1.3420$	-
Índice lactométrico	8.4 °L	-
Prueba de alcohol	No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol de 68 % en peso o 75 % en volumen	
Presencia de conservantes	Negativa	
Presencia de adulterantes	Negativa	
Presencia de neutralizantes	Negativa	

Factores que afectan la composición y la calidad de la leche:

La leche difiere en su composición, es muy difícil encontrar dos muestras idénticas. De los factores que influyen la calidad de la leche cruda del 26-36% están ligados al animal y son de carácter hereditarios, mientras que el 60% restante se deben a factores ambientales. La raza es el componente que más va a estar sometido a variaciones. Los factores que hacen variar la composición de la leche son: especie, raza, ordeño, tiempo de ordeño, periodo de lactancia,

estado nutricional, composición de los alimentos, condiciones de la vaca en el momento del parto, salud de la ubre, enfermedades, tratamientos farmacológicos.

.- Raza

La raza constituye hoy uno de los factores más relevantes a considerar en la composición de la leche, puesto que la grasa y proteína lácteas son caracteres genéticos con alta heredabilidad. Cuanto mayor es la producción, menor es el contenido de grasa y proteínas en la leche. Existen notables diferencias entre razas con relación a los componentes mayores de la leche, donde se distingue la raza Holstein con niveles de sólidos más bajos si se compara con otras razas como la Jersey, que registra la mayor composición media de la leche en las principales razas lecheras. Ayrshire, Brown Swiss Guernsey , Holstein, Jersey, Shorthorn Lechero.

Individualidad

Se han de escoger además entre las de una de esas razas, vacas que de mejor condición parezcan. Para esa lección hay que recurrir al análisis de su jugo lácteo, que patentiza las diferencias, enormes a veces, entre la riqueza de los principios butirosos del proceso de varios individuos de la misma raza, sometidos por los demás al propio trato. Hay variaciones individuales en la producción de leche durante el celo, con ligera tendencia a la disminución.

Herencia

La heredabilidad estimada para la producción de leche es relativamente baja (0.25), según Mercier y Vilotte (1993), sin embargo la heredabilidad estimada para la composición de la leche es bastante alta (0.50).⁴

Edad

La edad de la vaca influye bastante en la composición de jugo lácteo producido por ella. El de los animales de tres, cuatro y aun cinco años es rico en una materia grasa amarilla, algo aceitosa y muy aromática, que se aísla con facilidad y forma crema que produce, por batido, bastante difícil pero cierto, manteca muy fina, aunque en corta cantidad.

Hacia los seis años y hasta los nueve, aquella sustancia no abunda tanto; pero en cambio, predomina otro glicérido que da una crema más dura, más fácil de batir y más rica en manteca. Finalmente en los doce y los quince años, los anteriores cuerpos grasos son sustituidos por un glicérido de punto de fusión muy elevado, separación lenta e incompleta y sabor desagradable.

Las vacas jóvenes convienen para la fabricación de una pequeña cantidad de manteca buenísima y las de edad mediana para la obtención de un producto no tan excepcional pero de excelente clase en tanto que las vacas viejas dan poca manteca y es de calidad inferior.⁴

La leche de los animales jóvenes es por otra parte la más conveniente para la alimentación de los niños, por ser la más digestible y asimilable.⁴

Periodo de lactación

El tiempo comprendido entre un parto y el siguiente (305 días), El curso de la lactancia, no solo afecta la producción de leche, sino también la composición. Un aumento en el rendimiento de leche es seguido por una disminución en los porcentajes de grasa y proteína en leche mientras los rendimientos de estos componentes permanecen igual o en aumento. Al 1er o 2do mes del parto: Ascenso, Se mantiene de 3 a 4 meses: Auge, Decae paulatinamente 4 a 5 meses (Descenso)

Periodo de lactación Desde el punto de vista hormonal

Ascenso. Producido el parto se eliminan los estrógenos y la progesterona; la hormona lactogénica actúa libremente aunque aparece el celo (estrógenos), contrarresta la acción de la hormona lactogénica.

Descenso. Con la gestación se produce además de los estrógenos, la progesterona lo que ofrece más oposición a la hormona lactogénica.

Ordeño

Un ordeño incompleto aumenta el volumen de leche residual en la ubre, disminuye el porcentaje de grasa y la producción de leche en el siguiente ordeño, Después de un largo intervalo se obtiene mayor cantidad de leche con un contenido de grasa ligeramente menor. El número de ordeños está limitado por factores económicos, vacas de mayor producción, 2 a 3 ordeños. El intervalo entre ordeños, es más común de 12 horas o con ajuste de 10/14 horas, La composición láctea está relacionada inversamente con el número e intervalo en que se produce el mayor volumen de producción láctea.

Alimentación

Las vacas con bajos niveles de alimentación reducen la producción de leche y el porcentaje de lactosa solo dentro de ciertos límites, sin embargo se producen aumentos en el porcentaje de grasa láctea, Cualquier ración que aumenta la producción de leche reduce generalmente el porcentaje de grasa en la leche.

El uso de pastos de buena calidad en la alimentación de la vaca lechera trae como resultado un incremento en la producción de leche y en los rendimientos en grasa y proteína lácteas, Cuando el uso de concentrados en la dieta de la vaca lechera es elevado y constituye más del 60 por ciento de la misma se produce cierta depresión en el porcentaje de la grasa láctea. El color del jugo lácteo y de la manteca con la preparada es proporcional a la materia grasa contenida en el producto, variando también con la raza y la fecha del parto.

Enfermedades

Las enfermedades se reflejan en la leche alterando el volumen y calidad de la producción normal. La leche de vacas enfermas no debe destinarse al consumo, contienen diastasas perjudiciales al hombre. La leche enferma, representan un peligro, pueden ser portadores de gérmenes patógenos en alto grado (tuberculosis, brucelosis, etc.) Los medicamentos se eliminan en forma natural por la leche, siendo perjudiciales al hombre. Ocurrencia de desbalances

nutricionales, deficiencias o inadecuado manejo de los programas de alimentación para vacas lecheras pueden conducir a la aparición de varios trastornos en la salud de los animales los cuales se denominan enfermedades o trastornos metabólicos de la vaca lechera. Todas las enfermedades pero principalmente las febriles, además de reducir, según queda dicho la producción de leche influyen perjudicialmente en la composición de esta. Desde luego no convienen para la alimentación.

Medio ambiente

Las condiciones ambientales ejercen una influencia estacional en la producción y composición de la leche. El verano en las regiones cálidas determina un descenso acentuado en ambos parámetros. Las temperaturas elevadas ejercen un efecto negativo sobre el comportamiento digestivo de los animales, reduciéndose el consumo de materia seca total. Además ocurren alteraciones fisiológicas que modifican el funcionamiento del rumen. Ambos fenómenos determinan:

- Un menor consumo de energía
- Reducción en el consumo de fibra
- Alteración de las relaciones molares de los productos de fermentación ruminal.
- Reducción en el aporte de proteína
- Reducción en el aporte de minerales

Por tanto el medio ambiente repercute básicamente en la cantidad de nutrientes aportados al organismo.

Formas de contaminación de la leche

Desde el momento del ordeño hasta que llega al consumidor o se elaboran sus productos, en la leche caen muchos microorganismos que, con una conservación duradera aumenta la microflora y puede provocar cambios, como son: aumento de la acides, coagulación etc., ya que la leche es un medio apropiado para el desarrollo de muchos microorganismos. La cantidad adecuada

de los componentes de la leche asegura las sustancias alimenticias necesarias para el desarrollo de microorganismo, también ayuda la reacción ligeramente neutra que posee la leche en el momento del ordeño.

Glándulas

En la glándula mamaria casi siempre se encuentran microorganismos aunque se lave y se desinfecte bien su exterior. Por esta razón es que la primera leche que sale contiene mayor cantidad de microorganismos. Cuando la leche ha sido obtenida en condiciones óptimas, su microflora es variable y está compuesta fundamentalmente de micrococo y estreptococos. La condición principal para obtener una leche de buena calidad es la limpieza de las glándulas mamarias y la salud del animal.

En bovinos comúnmente se da la mastitis definida como la inflamación de la glándula mamaria y se caracteriza por causar alteraciones significativas en la composición de la leche y por el aumento en la concentración de células somáticas. La mastitis ha sido considerada mundialmente la enfermedad de mayor impacto en los establos lecheros, debido a la elevada prevalencia y los prejuicios económicos. En paralelo, la mastitis ejerce un efecto extremadamente negativo sobre la industria láctea en función del impacto que determina sobre la calidad de la leche

Las infecciones que suceden en la glándula mamaria aumentan el conteo de células somáticas (CCS). Estas células están presentes normalmente en la leche y está constituido en su gran mayoría por leucocitos sobre todo, neutrófilos y células de descamación del epitelio secretor de la glándula. Durante la evolución de la mastitis hay un flujo mayor de esas células para la glándula mamaria elevando su número

Aun en el caso de que la glándula mamaria sana, se reconoce que las primeras porciones de la leche ordeñada contienen microorganismos, disminuyendo su

número a medida que el ordeño avanza. Lo anterior puede verse reflejado en el ejemplo siguiente tabla:

Tabla No 3 Carga Bacteriana por Etapas de Ordeño

Leche primeras porciones	6500 gérmenes/ml
Leche a mitad del ordeño	1350 gérmenes/ml
Leche a final del ordeño	709 gérmenes/ml

Esto se explica porque el canal del pezón se encuentra colonizado por muchos microorganismos ejemplo. *Staphilococcus*, *Corinebacterium*, *Coliformes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc. Esta contaminación se ve acrecentada por el reflujo producido por el ordeño arrastrando con esto microorganismos que colonizan la punta del pezón hacia el interior de la ubre. Cuando la glándula mamaria se encuentra contaminada especialmente en los casos de mastitis de tipo agudo, los recuentos de microorganismos pueden ser muy elevados alcanzando valores de varios millones.

En la parte externa de la ubre y pezones, es posible detectar estiércol, barro, paja u otros residuos de la cama animal. Si bien la flora microbiana del interior de la ubre es, casi en su totalidad de tipo mesófilo, en el exterior se suman microorganismos psicrófilos y termófilos, formadores de espora, tanto aerobios como anaerobios que provocan serios problemas.

Entre los microorganismos que pueden llegar a la leche por la vía externa son importante señalar aquellos que son patógenos para el hombre, como: *Bacillus Cereus* que tiene la capacidad de generar esporas con cierta termo resistencia y que produce cuadros tóxicos en el hombre, debido a la producción de entero toxinas.

El *Clostridium Perfringens*, formador de espora anaerobios y termo resistente, provocan problemas a nivel en la industria y en la salud pública ocasionando

problemas de diarrea y fiebre. Otras bacterias como la *Salmonella typhi*, *Shigella*, *Streptococcus a* y *Corynebacterium diphtheriae*, pueden llegar a la leche a través del hombre.

Pieles de los animales

Es una vía de transmisión de microorganismos en la leche, ya que a ella pueden adherirse parte de excremento y alimento, los cuales pueden caer en la leche durante el ordeño. La microflora que contiene la leche cuando se contamina por suciedad de la piel puede ser de coliformes, bacterias proteolíticas, estafilococos, etc. Cualquier lesión en el animal puede causar una elevada contaminación, la ubre está en contacto con el suelo, heno, etc., animales enfermos (mastitis) causantes de esta enfermedad es el *Staphilococcus aureus*, el cual es resistente al tratamiento de antibióticos y no es destruida por la pasteurización, la enterotoxina que produce por su resistencia pudiendo llegar a causar enfermedades al consumidor.

Recipientes

Los recipientes que se utilizan para el colado y conservación de la leche originan diferentes tipos de microorganismos y así desde que se obtiene la leche hasta que llega al consumidor, va aumentando su microflora.

La microflora que cae en la leche, cuando los recipientes no han sido bien lavados, es de bacterias ácido lácticas. La leche es un medio favorable para el desarrollo de las bacterias. La microflora que pasa a la leche cuando los recipientes han sido lavados, pero no esterilizado es variada. Cuando los recipientes se someten a una esterilización discontinua la mayor parte de los microorganismos que se encuentran en la leche son los que forman esporas. Para evitar esto, los recipientes deben ser lavados primeramente con agua fría y después con agua caliente y desinfectantes.

Manos de los ordeñadores

Las manos son también trasmisoras de microorganismos principalmente patógenos; por eso, el ordeñador debe de lavarse bien las manos antes y

después de ordeño y no introducirlas en la leche. Al pasar de un animal a otro, el ordeñador puede transmitir los microorganismos patógenos a todo el rebaño, lo que contaminaría toda la leche. Una persona que padece de alguna infección también puede infectar la leche, volviéndola no apta para el consumo humano.

El ordeñador desempeña un rol de vital importancia en el control de los niveles sanitarios. Debe asegurar que se mantenga un estado de pulcritud en las instalaciones y utensilios, que los animales estén limpios y en buen estado de salud, además de observar su propia higiene personal.

Características organolépticas de la leche

Color

El color normal de la leche es blanco, el cual se atribuye a reflexión de la luz por las partículas del complejo caseinato-fosfato-cálcico en suspensión coloidal y por los glóbulos de grasa en emulsión. Aquellas leches que han sido parcial o totalmente descremadas o que han sido adulteradas con agua, presentan un color blanco con tinte azulado. Las leches de retención mastíticas presentan un color gris amarillento. Un color rosado puede ser el resultado de presencia de sangre o calostro. Otros colores (azul, amarillo, etc.), pueden ser producto de contaminación con sustancias coloreadas o de crecimientos de ciertos microorganismos. Una leche adulterada con suero de quesería puede adquirir una coloración amarillo-verdosa debida a la presencia de riboflavina

Olor

El olor de la leche es también característica y se debe también a la presencia de compuesto orgánico volátil de bajo peso molecular, entre ellos, ácidos, aldehídos, cetonas y trazas de sulfato de metilo. La leche puede adquirir, con cierta facilidad sabores u olores extraños, derivados de ciertos alimentos consumidos por las vacas antes del ordeño, de sustancias de olor penetrante o superficies metálicas con las cuales ha estado en contacto o bien de cambios,

químicos o microbiológicos que el producto puede experimentar durante su manipulación.⁵ (20)

Sabor

El sabor natural de la leche es difícil de definir, normalmente no es ácido ni amargo, sino más bien ligeramente dulce gracias a su contenido en lactosa. A veces se presenta con cierto sabor salado por la alta concentración de cloruro que tiene la leche de vaca que se encuentra al final del periodo de lactancia porque sufre de estado infeccioso de la ubre (mastitis); otras veces se presenta ácido cuando el porcentaje de ácidos en el producto es superior a 22-33ml NaOH 0.1 N/100ml (0.2-0.3% de ácido lácteo). Pero en general, el sabor de la leche fresca normal es agradable y puede describirse simplemente como característico.⁵

Textura

La leche tiene una viscosidad de 1.5-2.0 centipoises a 20°C ligeramente superior al agua (1.005cp) esta viscosidad puede ser alterada por el desarrollo de ciertos microorganismos capaces de producir polisacáridos que por la acción ligera del agua aumenta la viscosidad de la leche

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE

La complejidad bioquímica de la leche en su composición y su elevada actividad de agua la convierte en una de los alimentos naturales donde proliferan fácilmente la mayor parte de los microorganismos y bien se podría catalogar como un medio universal de cultivo (Hesschen, 1996)⁶

Los microorganismos en la leche tienen varias orientaciones. Unos son beneficiosos por las transformaciones que producen y otros perjudiciales y su control presenta aspectos sanitarios y comerciales, el primero se refiere al riesgo que el alimento puede suponer para la salud del consumidor cuando es portador de microorganismos patógenos o de sus toxinas y el segundo a las

características de conservación de la misma que viene determinada por la presencia de un mayor o menor número de flora saprofita, esta en elevadas concentraciones puede producir defectos y disminución de las propiedades nutritiva y organolépticas del producto.

Existen grupos de microorganismos (M.O) que son tomados como indicadores en la industria láctea, pues su presencia permitirá comprobar el cumplimiento de la aplicación de las buenas prácticas higiénicas.

Micro organismos indicadores:

- Bacterias aeróbicas mesófilas
- Coliformes totales y fecales
- Enterobacterias totales
- Enterococo

Los métodos de análisis para evaluar la calidad higiénico sanitaria de la leche han evolucionado sustancialmente desde la década de los 60, llegando a oficializarse los métodos convencionales de conteo en placa. Estos métodos universalmente conocidos tienen limitantes como son el excesivo tiempo de realización, amplia laboriosidad y utilización de gran cantidad de medios de cultivo, placas y otros insumos (Tejedor, 1998).⁷

MÉTODOS DE ENSAYOS RÁPIDOS DE DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS EN LA LECHE

Examen directo:

Cuando se examinan alimentos, no se debe desaprovechar la posibilidad de descubrir la presencia de microorganismos observando la muestra directamente al microscopio. Se puede montar una preparación con pequeña cantidad de material de la muestra y suspenderla en una gota de agua en un portaobjeto, cubrirla con un cubreobjeto y examinarla. En estos casos alternativamente puede utilizarse la iluminación de campo oscuro o la microscopia de contraste de fases.

Resulta relativamente fácil ver las levaduras y los mohos en esta preparación y, con cuidado y paciencia, es posible ver las bacterias. El elevado índice de refracción de las endoesporas bacterianas las hace especialmente fáciles de ver con óptica de contraste de fases, y si la preparación se hace como gota pendiente en el cubreobjeto montado sobre portaobjeto excavado, también es posible determinar si las bacterias son móviles.

Para que los M.O se puedan observar por esta técnica deben de estar presentes en concentraciones muy elevadas habitualmente en el orden de 10^6 . La gran ventaja de esta técnica es su rapidez, aunque en sus formas más sencillas no diferencia las células vivas de las muertas.

Citocromo E oxidasa.

Esta enzima cataliza la reducción del oxígeno a H_2O y es una importante terminal en el mecanismo de la respiración de ciertas bacterias, la misma puede ser utilizada como una medida de actividad metabólica y del número de M.O (micro organismos). En la detección se utiliza una prueba de reducción de colorantes con N,N1,N1 tetrametil-p-fenileno-diamina (TMPD), el cual ha sido extensamente utilizado en importantes pruebas taxonómicas. La prueba fue utilizada en la determinación y enumeración de psicrófilos Gram negativos en leche, la misma es simple, fácil y rápida brindando resultados en 5 min. El método puede detectar 10^4 ufc/mL o más, no siendo sensible para determinar organismos psicrófilos en leche pasteurizada fresca. Aunque luego de un período de pre incubación puede ser utilizada para predecir la calidad de la leche pasteurizada y productos lácteos (Kroll, 1989).⁷

Microcalorimetría.

Se basa en la medida de los pequeños cambios en la producción de calor resultante del crecimiento microbiano, estando implicadas las modificaciones en la entalpía. Esta técnica se ha utilizado con éxito para el recuento de bacterias durante la alteración de conservas enlatadas y el pan, así como la

diferenciación entre las Enterobacterias. Para la determinación de los datos microcalorimétricos se obliga el empleo de calorímetros especiales, los cuales pueden ser automatizados o computarizados, los dos tipos más utilizados son los *Calorímetros adiabáticos* y los *Fluxométricos térmicos*. El *CALVET* es uno de los más empleados. Gaida et al. (1990) plantea que en la práctica se han reportado muy buenos resultados en leche cruda con microrespirómetros de alta sensibilidad.⁸ Su principal desventaja es que no permite trabajar un gran número de muestras y que el instrumento requiere una inversión elevada (Goldschmidt, 1991)⁹

Flujo Citométrico.

Es un método automatizado para el conteo de células individuales previamente separadas y teñidas sobre una lámina, al pasar por un flujo laminar ubicado en el plano focal del detector. El procedimiento para la detección de levaduras en yogur fue desarrollado en Francia (Chemeflow), pero la técnica puede ser aplicada también en la detección de bacterias, tanto en leche como en productos lácteos. El sistema químico de flujo involucra nutrición y metabolismo de sustratos fluorogénicos por los M.O en cuestión con la consiguiente formación de productos finales intracelulares, los cuales fluorescen a la luz ultra violeta. La fluorescencia de las levaduras es detectada por el flujo citométrico y llevadas al display del instrumento, en dependencia del número e intensidad de la partícula fluorescente.

Impedancia.

La observación de las variaciones de impedancia debidas al metabolismo microbiano se reportó por primera vez en el año 1998 por Steward. No obstante es sólo en los últimos años que este procedimiento ha ganado interés debido a la disponibilidad de instrumentos modernos. La técnica se basa en los cambios electroquímicos de un medio de cultivo inoculado que dependen de la actividad metabólica de los M.O. Generalmente sustratos no cargados (ejemplos proteínas que son metabolizadas hasta aminoácidos,

carbohidratos hasta lactatos y lípidos a acetatos). Estas moléculas finalmente formadas son más pequeñas y por ende más móviles trayendo con ello cambios en la conductividad eléctrica y esta puede ser medible insertando sensores en el medio de cultivo inoculado.

La técnica se ha utilizado con éxito para predecir la vida útil de alimentos como la leche y quesos. La prueba puede ser específica para ciertos grupos de M.O utilizando medios de cultivos selectivos, así como para la identificación o separación de grupos de bacterias por sus respuestas características en cultivos puros (Scott y Robertson, 1985).¹⁰

Turbidimetría.

La medida de la turbidez no es una técnica nueva en microbiología ya que ha sido utilizada para estudiar el crecimiento bacteriano como una medida de la concentración. Las bacterias (y cualquier otra materia suspendida), absorben y dispersan la luz transmitida la cual es medida de una frecuencia fija registrando así los cambios turbidimétricos del medio de cultivo líquido al relacionarlo con el control estéril, cambios cualitativos que indican el crecimiento microbiano y los mismos pueden ser cuantificables cuando son calibrados contra parámetros cuantificables conocidos, tales como el conteo celular y/o el peso seco (Easter, 1998).¹¹

El *Método Turbidimétrico* es incluido en la mayoría de las diferentes revisiones sobre métodos rápidos de diagnóstico microbiológico empleados en alimentos (White, 1993 y Fung, 1994).¹² En estudios realizados por Dalgard et al, (1994) se utilizaron dos métodos turbidimétricos para la estimación de $\mu(\max)$. Uno es basado en las mediciones de la transmitancia y el otro en la absorbancia.

Ambos fueron comparados con las estimaciones obtenidas por el método de conteo de viables, concluyendo que las mediciones turbidimétricas pueden ser utilizadas confiablemente para la estimación de $\mu(\max)$.

Bioluminiscencia.

La *Bioluminiscencia* es otra técnica muy interesante. Se basa en una serie de reacciones enzimáticas (generalmente a cargo de oxidasas) que cursan con una emisión de luz y tiene lugar en determinados seres vivos, como por ejemplo en la luciérnaga. Para su procedimiento se obtiene la enzima luciferasa de un coleóptero de la familia Lampyres, el *Photinus pyralis*, la cual en presencia de sus dos sustratos, luciferina y ATP microbiano, produce una reacción bioluminiscente que se puede medir con un espectrofotómetro. La luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra, se puede por lo tanto hacer una estimación del número de M.O ya que el contenido de ATP en las células bacterianas es generalmente constante (1 fg ATP/cel) sobre circunstancias determinadas en las cuales la luciferina y luciferasa estén en exceso (Rodríguez, 1991).¹³

Limulus TEST.

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por la producción de endotoxinas a partir de la membrana celular, la cual está compuesta por una capa lipopolisacárida (LSP) y las mismas pueden ser detectadas por la formación de un gel o mediante ensayos colorimétricos usando un LAL (limulus amebocyte lysate) como reactivo. Este es preparado a partir de sangre del cangrejo de herradura *Limulus polyphemus*.

Una versión turbidimétrica de la prueba de limulus se utiliza para evaluar la flora Gram negativa en leche cruda. El valor de la prueba descansa en la rapidez con que pueden obtenerse los resultados, pudiéndose seleccionar los alimentos que tengan títulos elevados con esta prueba y ensayarlas después con otros métodos, mientras que los que tienen títulos bajos pueden situarse de inmediato en la categoría de alimentos pocos contaminados por bacterias Gram negativas viables (Mottar, 1987).¹⁴

Esta técnica ha sido evaluada por Moody et al. (1996) quien indicó que el

procedimiento de microplaca (LAL) puede usarse exitosamente en lugar del procedimiento en tubos. El procedimiento (LAL) entrega buenos valores de correlación ($r = 0.85$) cuando el suministro de reactivo es disponible. Las endotoxinas "Backgrounds" de la cristalería, agua, etc, pueden afectar los resultados con estos procedimientos, por lo tanto, deben tomarse extremo cuidado respecto a esto.

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS EN LA LECHE MÁS COMUNES

Bacterias gran positivas

Son de diferentes géneros, ampliamente distribuidas en la naturaleza; se encuentran en el suelo, y en cualquier lugar donde existan altas concentraciones de carbohidratos, proteínas, vitaminas y poco oxígeno. Su forma puede ser bacilar, cocoide u ovoide; soportan pH 4.0 en la leche y son anaeróbicas facultativas, mesófitas y termófilas y de crecimiento exigente.

Pueden ser homofermentativas (más del 90% de su metabolismo resulta en ácido Láctico) o heterofermentativas (producen además de ácido láctico, otros ácidos y gases).

Bacterias gran negativas

Enterobacterias; son huéspedes normales del intestino de los mamíferos, por lo tanto su presencia en el agua y en la leche se relacionan con contaminación de origen fecal, estas bacterias tienen gran importancia desde dos puntos de vista;

a.- Higiénico: ya que varias de estas especies tienen poder patógeno, de las cuales la más temible es la Salmonella y otras que pueden provocar trastornos gastrointestinales (Yersinia, E coli, Shigella).

b.- Tecnológico; ya que son bacterias heterofermentativas, grandes productoras de gases, además producen sustancias viscosas y de sabor desagradable, todo lo cual conduce a la alteración de la leche o subproductos.

De las enterobacterias, las más comunes encontradas en los productos lácteos son las del grupo coliforme. La determinación de su presencia indica calidad higiénica de la leche cruda y pasteurizada, las enterobacterias comunes de la leche cruda: E coli, Enterobacter aerogenes, Klebriella, Citrobacter, Salmonella, Shigella, Proteus, Serratia.

V- DISEÑO METODOLOGICO

Tipo de Estudio: De correlación transversal

Area de estudio: Fincas del Municipio de El Sauce Departamento de León, abastecedoras de leche al centro de acopio Esmilda Rizo.

Periodo de estudio: Marzo-Mayo 2014

Universo de Trabajo: 5 Fincas productoras de Leche cruda del Occidente del país

Muestra: Se tomaron tres muestras de cada fincas que consistían en tres tubos cónicos con 10ml de leche cada uno, para un total de 30ml por finca, en un primer muestreo, luego se tomó la misma cantidad de leche en un segundo muestreo, para un total de 60ml de leche por finca muestreada.

Variables a estudiar:

- Contenido de bacterias aerobias mesófilas
- Estado Sanitario de las fincas
- Antibiogramas

Criterios de inclusión:

- Fincas que consienten participar en el estudio
- Fincas que abastecen de leche cruda el centro de acopio

Criterios de exclusión:

- Fincas que NO consienten participar en el estudio
- Fincas que NO abastecen de leche cruda el centro de acopio
- Distancia de la finca al centro de acopio

Tab. No 5 Operacionalización de las variables de estudio

Variable	Definición	Unidad de medida
Bacterias aerobias mesofilas	Microorganismo capaz de crecer en medio con presencia de oxígeno	Ufc/ml
Estado sanitario	Es el cambio del estado de salud atribuible al antecedente del proceso sanitario (puede ser un cambio a mejor, o a peor, o no haber cambio).	%
Leche pos ordeño	Leche extraída de mamíferos posterior a exprimir de sus ubres, su contenido	%
Antibiograma	Método o prueba que determina la sensibilidad de los gérmenes a los antibióticos	Ufc/ml

VI. MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

- .- Tubos cónicos de 15 ml con tampón de rosca (falcom).
- .- Tubos de ensayo con tapón de hule.
- .- Azas bacteriológicas rectas y redondas.
- .- Platos Petri de vidrio (pyrex)
- .- Sensi disco de antibióticos
- .- Alcohol puro
- .- Kit para tinción Gram
 - azul de metileno
 - cristal de violeta
 - lugol
 - alcohol acetona
 - safranina
- .- Laminas porta objetos
- .- Aceite de inmersión
- .- Guantes de látex
- .- Cloro
- .- Mechero de alcohol
- .- Cerillos
- .- Termo
- .- Gel refrigerante
- .- Fichas de encuestas
- .- Lapiceros
- .- Medios de cultivo Muller-Hinton
- .- Medios Mackon-key
- .- Papel toalla
- .- Leche cruda

PROCEDIMIENTO

1. Preparación de la cristalería

La cristalería se lavó con jabón antibacterial y cloro, se esterilizo el día anterior al ensayo en autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

2. Preparación de los medios

2.1 Pesar la cantidad de medio de cultivo para microorganismo agar-caso (agar peptonado de caseína peptonada de harina de soya). El cual se prepara suspendiendo 40g en 100 ml de agua desmineralizada, el agua debe ser previamente calentada hasta ebullición y se agrega al agar, se calienta la suspensión hasta que se logra una solución clara, luego se cubre el recipiente de preparación (preferiblemente Erlenmeyer de 250 ml con tapón y retapa).

2.2 Autoclavar el Erlenmeyer sin cerrar totalmente el tapón de algodón-aluminio.

2.3 Sacar del autoclave, enroscar del todo el tapón e introducir el Erlenmeyer en un baño maría a 40°C al menos durante 30 minutos.

2.4 Distribuir el medio en las placas de Petri que están estériles en las proximidades del mechero, flameando bien la boca del Erlenmeyer para evitar las contaminaciones.

2.5 Dejar que el medio solidifique.

3. Muestreo

Para el muestreo se procede a considerar la procedencia de las fincas de las cuales se acopia leche de ordeño en dos momentos marzo-mayo, considerando el cambio de estaciones, verano- invierno para lo cual:

3.1 Muestreo No 1 se realizó según la siguiente descripción:

En fecha del 17-03-2014, disponiendo de la utilización de guantes, gabachas, nasobuco se procede a la desinfección superficial de la pichinga previa a la toma de la muestra. Se dispone de un mechero cerca del recipiente de toma de muestra para disminuir la cantidad de carga microbiana

- Finca los Chavarría de 5 pichingas, de 25 litros cada una, se tomaron 10 cc de leche como muestra por pichinga.
- Finca El Alboroto de 5 pichingas, de 25 litros cada una, se tomaron 10 cc de leche como muestra por pichinga.
- Finca la Virgen, de 5 pichingas, de 25 litros cada una, se tomaron 10 cc de leche como muestra por pichinga.
- Finca El Aguacate de 5 pichingas, de 25 litros cada una, se tomaron 10 cc de leche como muestra por pichinga.
- Finca El Madroño de 5 pichingas, de 25 litros cada una, se tomaron 10 cc de leche como muestra por pichinga.

3.2 Muestreo No 2 se realizó según la siguiente descripción:

En fecha del 26-05-2014, disponiendo de la utilización de guantes, gabachas, nasobuco se procede a la desinfección superficial de la pichinga previa a la toma de la muestra. Se dispone de un mechero cerca del recipiente de toma de muestra para disminuir la cantidad de carga microbiana

- Finca los Chavarría de 5 pichingas, de 25 litros cada una, se tomaron 10 cc de leche como muestra por pichinga.
- Finca El Alboroto de 5 pichingas, de 25 litros cada una, se tomaron 10 cc de leche como muestra por pichinga.
- Finca la Virgen, de 5 pichingas, de 25 litros cada una, se tomaron 10 cc de leche como muestra por pichinga.
- Finca El Aguacate de 5 pichingas, de 25 litros cada una, se tomaron 10 cc de leche como muestra por pichinga.
- Finca El Madroño de 5 pichingas, de 25 litros cada una, se tomaron 10 cc de leche como muestra por pichinga.

4. Transporte de las muestras

De las muestras previamente tomadas tanto para el primer y segundo momento se utilizaron tubos de ensayo de vidrio pyrex , previamente esterilizados. Los tubos conteniendo las muestras fueron transportados en termos con hielo hasta el laboratorio de ensayo de microbiología del CEVEDI en el *Campus Agropecuario* UNAN-León

5. Ensayo

5.1 Antibiogramas

5.2. Reactivos para el test de difusión por disco (Agar Mueller-Hilton)

De los medios disponibles se considera al agar M-Hilton el mejor para las pruebas de sensibilidad de rutina dado que:

- Muestra buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad
- Contiene bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina.
- Es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas.
- Existen suficientes datos recopilados que avalan la experiencia de las pruebas de sensibilidad realizadas en este medio

5.2 Preparación del agar Mueller Hilton

- Se prepara el agar M-Hilton a partir de la base deshidratada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
- Inmediatamente después de esterilizar se enfría en baño de agua hasta 45-50°C.
- Se distribuye el medio en las placas de Petri hasta un nivel aproximado de 4 mm. Esto corresponde a 60 - 70 ml de medio para placas de 150 mm. de diámetro y 25 a 30 ml. para las de 100 mm. de diámetro interno.
- Las placas que no se usan en el día pueden mantenerse en refrigerador (2-8 °C.).
- Las placas con más de 7 días de preparación no son adecuadas para las pruebas de sensibilidad salvo que sean envueltas

en bolsas de plástico para evitar la desecación, de lo contrario deberán controlarse con los microorganismos de referencia, como se especifica en la sección 9.2.

- Debe controlarse la esterilidad de cada lote incubando 24 horas o más a 30-35 °C. Luego descarte esas muestras.

5.3 Procedimiento para la realización del test de difusión por disco

5.3.1 Preparación del inóculo

- Seleccione 4 ó 5 colonias bien aisladas de igual morfología de la placa de cultivo. Prepare una suspensión en 4 ó 5 ml de un caldo apropiado (p.ej: Tripteina Soja) tocando la parte superior de cada colonia.
- Incube a 35 °C hasta que este alcance o exceda la turbidez del estandar (2-6 hs).
- Ajuste la turbidez del inóculo con solución salina o caldo hasta el tubo 0,5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual con el estandar. Para ello, mire los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste. Esta suspensión contendrá aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml para *E.coli* ATCC 25922.

5.3.2 Método directo de inoculación a partir de colonia aislada

- Como un método alternativo al descrito anteriormente el inóculo puede ser realizado en solución salina o caldo a partir de colonias seleccionadas de una placa de cultivo no selectivo de 18 a 24 horas de incubación. Inmediatamente la suspensión debe ser ajustada a la escala 0,5 de Mc Farland

5.3.3 Inoculación de las placas

- Dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo siembre las placas de M. Hilton con un hisopo estéril. Presione el hisopo contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso de inóculo.

- Inocule la superficie seca del M. Hilton por hisopado en tres direcciones para asegurar una completa distribución del inóculo. Las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y el desarrollo confluyente o casi confluyente.
- Si crecen solo colonias aisladas el antibiograma debe repetirse.
- Espere de 3 a 5 minutos, pero no más de 15 min, antes de aplicar los discos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido.

5.3.4. Aplicación de los discos de ATB en las placas inoculadas

- Colocar los discos sobre la superficie del agar inoculada con pinza estéril aplicando una ligera presión a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar. No deben colocarse más de 12 discos por placa de 150 mm y no más de 5 discos por placa de 100 mm.
- Incubar las placas invertidas a 35 °C dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron aplicados. Con excepción de *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus* spp. (ver sección 6), las placas no deberán ser incubadas en concentración incrementada de CO₂ porque los estándares de interpretación fueron desarrollados usando incubación ambiente y el agregado de CO₂ alteraría significativamente el tamaño de las zonas inhibitorias para algunos agentes antibióticos.

6. Lectura de las placas e interpretación de resultados

- Después de 16 a 18 horas de incubación examine cada placa y mida los diámetros de las zonas de inhibición. Si las placas fueron satisfactoriamente hisopadas y el inóculo fue el correcto, las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y habrá desarrollo confluyente. Si el microorganismo estudiado es un *Staphylococcus* spp. o *Enterococcus* spp., incube 24 horas para vancomicina y oxacilina, pero los otros antimicrobianos pueden leerse entre las 16-18 hs. Use luz transmitida para examinar un ligero crecimiento de cepas metilino o vancomicina resistentes dentro de las zonas de inhibición. Cualquier desarrollo dentro de la zona de inhibición es indicativo de metilino

o vancomicina resistencia

- El punto final deberá tener en cuenta el área que no muestre desarrollo obvio a ojo desnudo, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona. Colonias mayores creciendo dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. Algunos *Proteus* spp. podrían presentar “swarming” dentro de las zonas de inhibición con algunos antimicrobianos. En estos casos el velo del “swarming” debería ser ignorado. En medios suplementados con sangre, se deberá medir la zona de inhibición del crecimiento, no la zona de inhibición de la hemólisis. Cuando se prueban discos de trimetoprima/sulfametoxazol pueden arrastrarse sustancias antagónicas que producen un crecimiento con aspecto de niebla dentro de la zona del halo de inhibición, en estos casos no considerar en la lectura un crecimiento del 20% o menos del desarrollo total

6.1. Determinación de BAM

Procedimiento para Determinación de Microorganismos Recomendaciones Generales:

- Toda muestra deberá analizarse bajo condiciones asépticas.
- El tiempo transcurrido desde la primera dilución hasta su incorporación en el medio de cultivo, no deberá exceder de una hora.
- Antes de proceder a realizar el análisis microbiológico los envases que contienen la muestra, deberán ser limpiados con algodón y alcohol de 70⁰, y se debe esperar a que seque el envase para luego iniciar el trabajo

6.1.1. Recuento De Organismos Mesofilos Aerobios

Método En Placa:

NOTA: En función del grado de contaminación esperado en el producto, efectuar las diluciones decimales que se estimen convenientes para que 1 g contenga entre $< 10^4$ UFC / g (mayor significado estadístico). Cuando no se tiene

antecedentes a respecto es conveniente efectuar hasta la dilución 10^{-3} y ampliar o reducir el número de diluciones en base a la experiencia

Efectuar tres diluciones decimales:

- Primera dilución: se toman 10 ml de muestra. Se añaden a 90 ml del diluyente seleccionado contenido en un Erlenmeyer.
- Segunda dilución: Transferir 1 ml de la primera dilución a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de solución diluida de Fosfatos pH 7.2 (diluyente).
- Tercera dilución: Transferir 1 ml de la segunda dilución a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de solución diluida de Fosfatos pH 7.2 (diluyente).

NOTA: Utilizar una pipeta única para cada dilución.

- Simultáneamente inocular por duplicado 1 ml de cada dilución del producto en platos petri, añadir a cada placa 15-20 ml de medio Agar tripticaseína previamente esterilizado y mantenido en baño María a temperatura entre 45-48 °C (para mantenerlo fundido).
- Con movimientos suaves rotatorios, mezclar la alícuota de la muestra con el medio de cultivo, evitando que se produzca un derrame. Permitir que el medio solidifique e incubar las placas en posición invertida a 35 °C - 37 °C , durante 48 - 72 horas.
- Después del período de incubación contar el número de UFC con ayuda del contador de colonias. Se determina la media o promedio de UFC por cada dilución. Informar el número de UFC por gramo o por ml del producto, considerando el factor de dilución de la muestra.

El producto se acepta si se observan UFC en cantidades menores de 10^5 UFC por ml de muestra.

6.2. Recuento De Hongos Filamentosos y Levaduras

- Se procedió igual como se indica en el recuento de organismos mesofilos aerobios, con la excepción que se utiliza el medio agar dextrosa -

sabouroud o agar dextrosa - papa. incubar a 22⁰C - 25⁰C durante cinco a siete días.

- Después del período de incubación contar el número de UFC existentes con ayuda del contador de colonias. Informar el número de UFC por ml de muestra, tomando en cuenta el factor de dilución de la muestra. El producto se acepta si hay ausencia de colonias o la cantidad existente es menor de 10² colonias por ml de muestra

6.3. Determinación De Microorganismos Patógenos.

Staphylococcus aureus

Medir 10 ml de muestra con 90 ml de cultivo enriquecido a 35⁰C - 37⁰C, durante 24 -48 horas. Examinar el medio visualmente. Si hay crecimiento, a partir del caldo, hacer una resiembra por estría cruzada en Agar Bair Parker e incubar los platos en posición invertida a 35⁰C - 37⁰C, durante 24-48 horas. Deberá establecer la ausencia del patógeno para considerar conforme la prueba

Salmonella

- Medir 10 ml de muestra y añadir a un volumen de 90 ml de Caldo Lactosa e incubar a 35⁰C - 37⁰C, durante 24-48 horas. Examinar el medio para ver si hay crecimiento (turbidez). Si lo hay, agitar el medio y tomar 1ml y añadirlo a tubos de ensayo (2) que contienen 10 ml de caldo selenito-cistina y caldo tetratoato. Mezclar e incubar de 12 a 24 horas a 35⁰C - 37⁰C
- Una vez incubado, con un asa se toma una muestra a los tubos de ambos caldos y se efectúa una resiembra al menos en dos medios sólidos diferentes. Se puede elegir entre los siguientes: Agar verde brillante, xilosa-lisine-dexosicolato y agar citrato- desoxicolato. Invertir los platos e incubar a 35⁰C - 37⁰C, durante 48 - 72 horas. Deberá establecer la ausencia del patógeno para considerar conforme la prueba

Escherischia coli

- Medir 10 ml de muestra y añadir a un volumen de 90 ml de caldo Lactosa e incubar a 35-37⁰C, durante 24-48 horas. Examinar el medio para ver si hay crecimiento (turbidez). Si lo hay, transferir con un asa al Agar Mac Conkey. Incubar de 48 a 72 horas a 35-37⁰C. Deberá establecer la ausencia del patógeno para considerar conforme la prueba.

VI. RESULTADOS Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Tabla No 6: Estado Sanitario de Fincas Primer Muestreo.

Primer Muestreo		Finca 1	Finca 2	Finca 3	Finca 4	Finca 5
Fecha 17/03/2014						
Estado Sanitario						
1	Practica de ordeño limpio (Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si
2	Lavado y secado de ubres (Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si
3	Designación de labores (Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si
4	Sala de ordeño					
	4.1 Presente (Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si
	4.2 Techado (Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si
	4.3 Superficie (concreto/tierra)	C	C	T	C	C
5	Agua limpia (Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si
6	Limpieza de lugar de Ordeño (Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si

Tabla No 7 Estado sanitario de fincas segundo muestreo

Segundo Muestreo		Finca 1	Finca 2	Finca 3	Finca4	Finca 5
Fecha 26/05/2014						
Estado Sanitario						
1	Practica de ordeño limpio(Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si
2	Lavado y secado de ubres(Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si
3	Designación de labores (Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si
4	Sala de ordeño					
	4.1 Presente (Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si
	4.2 Techado (Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si
	4.3 Superficie (concreto/tierra)	C	C	T	C	C
5	Agua limpia (Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si
6	Limpieza de lugar de Ordeño (Si/No)	Si	Si	Si	Si	Si

La tabla 6 y 7 muestra el estado sanitario de las fincas para el primer y segundo tiempo de muestreo, en periodos climatológicos diferentes (marzo verano y mayo invierno), evidenciando de acuerdo a ficha de evaluación de información que existe cumplimiento de condiciones sanitarias en un 100 % de las variables evaluada, en las prácticas de ordeño limpio las que inciden sobre la carga microbiana de leche cruda suministrada para el centro de acopio de “Esmilda Rizo”

Tabla No 8: Manejo de leche pos ordeño primer muestreo

Manejo de la Leche desde el Ordeño al centro de acopio		Finca 1	Finca 2	Finca 3	Finca 4	Finca 5
Fecha 17/03/2014		S/N	S/N	S/N	S/N	S/N
1	Tipo de Balde para ordeño					
	1.1- Plástico	Si	Si	Si	Si	Si
	1.2- Aluminio	No	No	No	No	No
2	Lavado de baldes para el ordeño	Si	Si	Si	Si	Si
3	Filtrado primario de la leche	No	No	No	No	No
	Tipo de utensilios para el transporte					
4	4.1 pichinga de plástico					
	4.2 pichinga de aluminio	Si	Si	Si	Si	Si
5	Lavado de utensilios de transporte	Si	Si	Si	Si	Si
6	Medio de transporte(V/M/B)*	V	V	B	M	M
7	Tiempo de transporte(hrs)	35 min.	30 min	25 min	35 min	30 min
8	Mantenimiento de la leche (S/N)	No	No	No	No	No

* V: vehículo, M: moto, B: bicicleta

Tabla No 9: Manejo de la leche pos ordeño segundo muestreo

Manejo de la Leche desde el Ordeño al centro de acopio		Finca 1	Finca 2	Finca 3	Finca 4	Finca 5
Fecha 26/05/2014		S/N	S/N	S/N	S/N	S/N
1	Tipo de Balde para ordeño					
	1.1 Plástico	Si	Si	Si	Si	Si
	1.2 Aluminio	No	No	No	No	No
2	Lavado de baldes para el ordeño	Si	Si	Si	Si	Si
3	Filtrado primario de la leche	No	No	No	No	No
Tipo de utensilios para el transporte						
4	4.1 pichinga de plástico					
	4.2 pichinga de aluminio	Si	Si	Si	Si	Si
5	Lavado de utensilios de transporte	Si	Si	Si	Si	Si
6	Medio de transporte(V/M/B)	V	V	B	M	M
7	Tiempo de transporte(hrs)	35 min	30 min	25 min	35 min	30 min
8	Mantenimiento de la leche (S/N)	No	No	No	No	No

* **V:** vehículo, **M:** moto, **B:** bicicleta

Las tabla 8-9 muestra el manejo de leche pos ordeño de las fincas hacia el centro de acopio en dos diferentes épocas del año, evidenciando de acuerdo a la ficha de evaluación de información que existe cumplimiento de condiciones sanitarias en un 100 % del manejo de la leche cruda pos ordeño al centro de acopio de Esmilda Rizo, igualmente que las buenas prácticas de ordeño indicadas en la tabla 6, el pos ordeño incide sobre la carga microbiana de leche cruda.

Tabla 10 Antibiogramas de leche cruda de fincas al centro de Acopio Esmilda Rizo.

Procedencia	Cepas	Cantidad encontradas	Norma 03-027-99	1° muestreo 17/03/2014	antibiograma susceptibilidad
Finca N° 1 Chavarría	Estafilococos E.coli	6x10 ⁻² ufc/ml 10x10 ⁻³ ufc/ml		Resistencia amoxicilina , oxitetraciclina, ciprofloxacina	
Finca N°2 el Alboroto	Estafilococos	5x10 ⁻³ ufc/ml	Clase A : 400 000 col/ml	amoxicilina , oxitetraciclina, ciprofloxacina vancomicina	
Finca N° 3 la Virgen	Estafilococos E.coli	2x10 ⁻¹ ufc/ml 2x10 ⁻³ ufc/ml	Clase B 1000 000 col/ml	Amoxicilina+clavulanico CAZ Ampicilina Oxitetraciclina ceftriaxona	
Finca N° 4 El Aguacate	Estafilococcus	10x10 ⁻³ ufc/ml		CAZ	
Finca N° 5 El Madroño	E.coli	3x10 ⁻⁴ ufc/ml		Resistencia a ampicilina Amoxicilina+clavulanico	

Tabla 11 Antibiogramas de leche cruda de fincas al centro de Acopio Esmilda Rizo.

Procedencia	Cepas	Cantidad encontradas	Norma 03-027-99	2° muestreo 29/05/2014	
Finca N° 1 Chavarría	E.coli	2x10 ⁻² ufc/ml		Resistencia Amoxicilina, Oxitetraciclina, Ciprofloxacina Amikacina	
Finca N°2 el Alboroto	E.coli	3x10 ⁻² ufc/ml	Clase A : 400 000 col/ml	Resistencia Amoxicilina, Oxitetraciclina, Ciprofloxacina	
Finca N° 3 la Virgen	E.coli	2x10 ⁻³ ufc/ml 4x10 ⁻² ufc/ml	Clase B 1000 000 col/ml	Resistencia Amoxicilina, Oxitetraciclina, Ciprofloxacina	

Finca N° 4 El Aguacate	E.coli	2×10^{-2} ufc/ml		Resistencia Amoxicilina, Oxitetraciclina	
Finca N° 5 El Madroño	E.coli	3×10^{-3} ufc/ml		Resistencia a Ampicilina Amoxicilina+clavula nico	

La tabla 10-11 muestra los resultados obtenidos de antibiogramas para los diferentes tiempos de muestreo, de lo cual se evidencia que el patógeno más frecuente encontrado corresponde a *E.coli* así como *Estafilococos aureus*, para las cinco fincas evaluadas, de las cuales Finca N°1 Chavarría y Finca N°3 la Virgen mostraron incidencia de un patógeno únicamente para el segundo momento de muestreo en el presente estudio, así mismo, los valores obtenidos del recuento de patógeno se encuentran dentro de los valores establecidos por la norma para unidades formadora de colonias, lo que a su vez permite establecer la calidad de la leche cruda suministrada al centro de acopio, no obstante de acuerdo a las tablas 6 y 7 de manejo de leche cruda, ordeño y pos ordeño puede evidenciarse igualmente que la presencia de *E coli* Indica una mala higiene del ordeñador siendo que *E coli* es parte de la flora bacteriana normal en el hombre.

VII. CONCLUSIONES

El presente estudio evidencia que la leche cruda de ordeño que capta el centro de acopio Esmilda Rizo cumple con los parámetros de Estado sanitario y manejo de leche de ordeño, no obstante según los análisis microbiológicos indicaron contaminación por patógenos como *E.coli* y *E.aureus*, en 5 fincas (100%)

Es importante mencionar que los procedimientos para mejorar la calidad de la leche en los establos son extremadamente complejos que requiere del esfuerzo conjunto de todos los sectores relacionados. Es así, que se deben implementar programas que incluyan los conceptos presentados, lo que, contribuirá para estimular el conocimiento y el procedimiento para mejorar la calidad de la leche que es imprescindible para el desarrollo de la producción pecuaria y su mantenimiento como actividad económica viable y lucrativa así como, de la más alta relevancia para la salud pública.

De lo anterior considerando la información obtenida muestra cumplimiento con el estado sanitario descrito en la NTON 03-027-99 sobre la sala de ordeño, pero la evidencia de contaminación bien puede deberse a manipulación de la leche durante la práctica de ordeño por los trabajadores, siendo esta la principal causa de contaminación para este tipo de patógeno.

VIII. RECOMENDACIONES

- Que los productores de leche implementen programas y medidas encaminadas a mejorar la sanidad del hato ganadero, para tratar de mantener saludable a las vacas lecheras.
- Que higienicen y sanitasen las instalaciones y los equipos destinados a la ordeña y almacenamiento de la leche cruda.
- Los responsables de los centros de acopio agilicen y modernicen el sistema de transporte de leche hacia la industria láctea, para minimizar el tiempo de espera.
- Que la industria láctea mantenga un control adecuado de la leche que se reciba y que los procedimientos analíticos, aseguren la calidad final del producto.
- Siendo que las actividades post-ordeño tienen el propósito de proteger las vacas de infecciones y prevenir la contaminación de la leche para conservar su calidad. El post-ordeño considera el manejo de las vacas desde el sellado de los pezones hasta la salida del área de ordeño

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Alvarez MA. Tendencias de la reestructuración agroindustrial de la actividad lechera mexicana. En: Martínez BE, Alvarez MA, García HL, Del Valle MC coordinadores. Dinámica del sistema lechero mexicano en el marco regional y global. Plaza y Valdés Editores, UNAM, UAM-Xochimilco. México. 1999:183-202.
2. Allison JRD. Antibiotics residues in milk. *British Veterinary Journal*; 1995;(141):9-16
3. Bramley AJ. Current concept on bovine mastitis. 4th ed. Arlington, USA: National mastitis council; 1996.
4. Brito MAVP. Conceitos basicos da qualidade da leite. In: Brito JRF, Dias JC. Sanidade do gado leiteiro. Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL/sao Paulo, Tortuga. 1995:55-62.
5. Bhemer MLA. Tecnología do leite. 10ª ed. Sao Paulo, Brasil: Nobel; 1980
6. Blowey R, Edmondson P. Mastitis control and dairy herds. Farming Press; 1995.
7. DOF, Diario oficial de la federación. NOM 110-SSA1. Procedimientos para la toma y transporte de muestras para su análisis microbiológico.1994.
8. Harding F. Milk quality. Glasgow; Chapman and Hall; 1995.
9. Heeschen W, Reichmuth J. Mastitis: influence on qualitative and hygienic properties of milk. 3er International mastitis seminar. Tel Aviv. 1995.
10. Jay JM. Microbiología moderna de los alimentos. 3ed Acribia. Zaragoza, España; 1994.
11. Mariscal, P.C.A et al. Características microbiológicas de leche cruda de vaca en mercados de abasto de Trinidad, Bolivia. *Agrociencias Amazonia*, 2015

Vol.1(2):18-24.en

<http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2307...script=sci>.

12. Margariños H. Producción higiénica de la leche cruda. Una guía para la pequeña y mediana empresa. 1ª ed. Guatemala, Guatemala: Producción y Servicios Incorporados S.A. 2001.
13. Norma Técnica Nicaragüense de La Leche Entera Cruda N ° 03 027-99
14. Ortiz OG, Avila DA, Lagunes LJ, Castañeda MO, López GI, Aguilar BU, Román PH, Villagómez CJA, Aguilera SR, Quiroz VJ, Calderón RR. Manejo de ganado bovino de doble propósito en el trópico. INIFAP. CIRGOC. Libro Técnico Núm. 5. Segunda edición. Veracruz, México. 2002:161.
15. Reneau JK, Packard VS. Monitoring mastitis, milk quality and economic losses in dairy fields. Dairy, food and environmental sanitation 1991:4-11.
16. Sedesol. Manual de normas de control de calidad de leche cruda. 6ª Revisión. Liconsa. Dirección de producción; 2007: 1-28.
17. Sepúlveda AJF. Uso de los laboratorios para control de mastitis y mejorar la calidad de leche. Entorno ganadero. 2006;(18):7-10.
18. Spreer E. Lactología industrial. 2ª ed. Zaragoza, España: Acribia; 1991.
19. Schallibaum M. Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese. NMC. Annual meeting proceedings. 2001.

ANEXOS

FICHA DE ENCUESTA EN EL PROCESO DE ORDEÑO

Centro de acopio lácteos "Doña Esmilda" municipio de "El Sauce"

Nombre del productor: _____

Nombre de la finca: _____

Fecha: _____

Vacas en producción: _____

Código de muestra: _____

❖ Estado Sanitario:

I.- Practica de Ordeño Limpio

1.- Lavado y secado de ubres si ___ No_

2.- Designación de labores si ___ No_

3.- Sala de Ordeño:

Presente..... Si ___ No_

Techado..... Si ___ No_

Superficie..... Concreto ___ Tierra___

4.- Agua limpia..... Si___ No___

5.-Limpieza del lugar de Ordeño..... Si___ No_

❖ Manejo de la leche desde el ordeño al centro de Acopio.

1. Tipo de Balde para el Ordeño:_____

2. Lavado de Baldes para el ordeño:_____

3. Filtrado Primario de la Leche:_____

4. Tipos de utensilios para el transporte:_____

5. Lavados de utensilios de transporte:_____

6. Lavado de plásticos:_____

7. Método de transportes: _____
8. Tiempo de transporte: _____
9. Mantenimiento de la Leche.: _____



Foto N° 1. Toma de muestra en el centro de acopio (autor propio)



Foto N° 2: Análisis de las muestras (autor propio)



Foto N°3; Preparación de los medios de cultivo (autor propio)



Foto N° 4: Análisis de los resultados en los cultivos (autor propio)



Foto N° 5: Análisis de los resultados en los cultivos (autor propio)



Foto N° 6: Análisis de los resultados en los cultivos (autor propio)





Foto N° 6: Especimen participante en el estudio (izquierda)