



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS DE LA LECHE CRUDA DE BOVINO
COMERCIALIZADA EN EL MERCADO SAN ALFONSO DE LA
CIUDAD DE RIOBAMBA”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: JENNIFER JOHANNA LLUGUÍN LASCANO

TUTORA: DRA. SANDRA ESCOBAR

Riobamba-Ecuador

2016

©2015, Jennifer Johanna Lluquín Lascano

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Jennifer Johanna Lluquín Lascano

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **“ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE LA LECHE CRUDA DE BOVINO COMERCIALIZADA EN EL MERCADO SAN ALFONSO DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA**, de responsabilidad de la señorita Jennifer Johanna Lluquín Lascano, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Sandra Escobar

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dra. Ana Karina Albuja

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Dr. Carlos Espinoza

PRESIDENTE TRIBUNAL

**NOTA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jennifer Johanna Lluquín Lascano, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría, y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación

Riobamba 10 de Febrero del 2016

JENNIFER JOHANNA LLUGUÍN LASCANO

060409505-9

DEDICATORIA

Han sido cinco años de lucha, constancia, sacrificio, esfuerzo y dedicación incansables los que he vivido, atravesando por momentos gratos y otras veces difíciles pero manteniendo firme en la persecución de uno de mis mayores sueños gracias al apoyo incondicional de personas muy importantes para mí, es así que este trabajo se les dedico:

A Dios por ser mi amigo inseparable en todo momento, bendecirme y llenarme de valentía para enfrentar todas las barreras que en el transcurso de la carrera se me fueron presentando.

A mi abuelita y mi padre por ser el pilar fundamental en mi vida, por haber guiado con su ejemplo y sabios consejos mi camino, por pelear junto a mí toda batalla, por transmitirme valores y principios para ser un mejor ser humano, por apoyar y fortalecer mis metas y sobre todo por jamás abandonarme en la lucha de mis propósitos. A pesar de que ya no estés junto a mí papi sé que desde el cielo iluminas cada paso que doy.

A mí amada familia por compartir junto a mí nuevas experiencias y en cada una de ellas sembrar el deseo de superación y anhelo de triunfo en la vida.

A Santiago por ser mi compañero incondicional en este caminar politécnico, quien ha sabido brindarme su amor, paciencia, ayuda, apoyo y experimentar junto a mí nuevas vivencias dejando en ellas lo mejor de sí y por instante a instante animarme para no decaer en la lucha por mis ideales.

A mis amigos y amigas que compartieron conmigo momentos inolvidables y me demostraron que puedo contar con ellos en todo momento.

Jennifer

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme cumplir una meta más en mi vida y por el maravillo y preciado regalo que es mi vida.

A mis padres por ser mi mayor fuente de inspiración y apoyarme moral y económicamente en la persecución de mis ideales.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por abrirme sus puertas hacia la enseñanza para poder convertirme en una profesional competente.

A la Dra. Sandra Escobar por haber dirigido este trabajo de investigación con su intelecto y gran experiencia.

A la Dra. Anita Albuja por su orientación y asesoramiento en el proceso de realización del presente trabajo.

A todos los docentes de la Escuela de Bioquímica y Farmacia por compartir sus conocimientos e ir formándome en el ámbito profesional.

A mis familiares por sus constantes palabras de aliento y por brindarme sus manos solidarias en la construcción de mis sueños.

A Santiago por no abandonarme en la conquista de mis sueños y estar siempre presto a ayudarme

Jennifer

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. Definiciones de leche y leche cruda.....	3
<i>1.1.1. Leche.....</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2. Leche cruda</i>	<i>3</i>
1.2. Síntesis y secreción de leche cruda	3
1.3. Composición química de la leche cruda	4
1.4. Valor nutricional	4
1.5. La leche como sustrato bacteriano	5
1.6. Microorganismos presentes en la leche cruda	6
1.7. Peligros de la leche cruda	8
1.8. Razones de consumo de leche cruda.....	9
1.9. Contaminación de leche cruda.....	9
<i>1.9.1. Contaminantes químicos.....</i>	<i>10</i>
<i>1.9.2. Contaminantes biológicos.....</i>	<i>11</i>
1.10. Calidad de la leche cruda	14
1.11. Calidad microbiológica.....	14
<i>1.11.1. Calidad higiénica de la leche cruda e indicadores microbiológicos.....</i>	<i>14</i>
1.12. Uso de antibióticos en ganadería lechera	17
1.13. Riesgos de la leche con residuos de antibióticos	18
<i>1.13.1. Resistencia bacteriana.....</i>	<i>18</i>
1.14. Métodos de identificación y confirmación de la presencia microorganismos indicadores en la leche cruda	21
<i>1.14.1. Placas Petrifilm</i>	<i>21</i>
<i>1.14.2. Agar para Métodos Estándar.....</i>	<i>22</i>
<i>1.14.3. Método del Número más probable (NMP)</i>	<i>22</i>
<i>1.14.4. Agar Eosina azul de metileno (EMB).....</i>	<i>23</i>
<i>1.14.5. Agar Manitol Salado</i>	<i>23</i>
<i>1.14.6. Agar Nutritivo.....</i>	<i>23</i>
<i>1.14.7. Tinción de Gram</i>	<i>24</i>
1.15. Antibiograma.....	24
<i>1.15.1. Descripción de los discos de antibióticos.....</i>	<i>24</i>

1.16.	Descripción del mercado “San Alfonso”	27
CAPÍTULO II		
2.	PARTE EXPERIMENTAL	29
2.1.	Lugar de la investigación.....	29
2.2.	Factores de estudio	29
2.2.1.	<i>Población</i>	29
2.2.2.	<i>Muestra</i>	29
2.3.	Materiales, Equipos y Reactivos	30
2.4.	Metodología	31
2.4.1.	<i>Recolección y transporte de muestras</i>	31
2.4.2.	<i>Preparación de la suspensión inicial y diluciones</i>	32
2.4.3.	<i>Recuento de bacterias Coliformes totales, Escherichia coli, Aerobios mesófilos y Staphylococcus aureus por la técnica de Petrifilm según 3M</i>	32
2.4.4.	<i>Determinación de Escherichia coli en Agar para Métodos Estándar</i>	33
2.4.5.	<i>Determinación de microorganismos Coliformes totales por la técnica del Número más probable (NMP)</i>	33
2.4.6.	<i>Confirmación de Staphylococcus aureus mediante fermentación del manitol</i>	35
2.4.7.	<i>Aislamiento de colonias de Escherichia coli y Staphylococcus aureus empleando Agar nutritivo</i>	36
2.4.8.	<i>Tinción Gram</i>	37
2.4.9.	<i>Antibiograma mediante el Método de difusión en agar según Kirby Bauer</i>	37
2.4.10.	<i>Colocación de los discos de antibióticos</i>	39
2.4.11.	<i>Procedimientos Estadísticos</i>	39
CAPÍTULO III		
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1.	Procedimiento Estadístico	40
3.1.1.	<i>Estadístico de Levene</i>	40
3.1.2.	<i>ANOVA de un factor</i>	40
3.2.	Análisis microbiológico de la leche cruda	41
3.2.1.	<i>Recuento de Coliformes Totales y Escherichia coli</i>	41
3.2.2.	<i>Determinación de Escherichia coli en Agar para Métodos Estándar</i>	45
3.2.3.	<i>Determinación del número más probable (NMP) para microorganismos Coliformes totales</i>	45
3.2.4.	<i>Crecimiento de E. coli en agar eosina azul de metileno</i>	46
3.2.5.	<i>Aerobios mesófilos</i>	47
3.2.6.	<i>Staphylococcus aureus</i>	49

<i>3.2.7. Confirmación de la presencia de Staphylococcus aureus en muestras de leche cruda</i>	52
<i>3.2.8. Tinción Gram</i>	52
<i>3.2.9. Antibiograma de Escherichia coli</i>	53
<i>3.2.10. Antibiograma de Staphylococcus aureus</i>	54
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES	
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1-3:	Crecimiento de bacterias en Agar para Métodos Estándar	45
Cuadro 2-3:	Confirmación de <i>Escherichia coli</i>	47
Cuadro 3-3:	Muestras de leche cruda en las que fermentó el agar manitol salado...	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos.....	21
Figura 2-1:	Mercado “San Alfonso” de la ciudad de Riobamba.....	28
Figura 1-2:	Muestras de leche cruda en las que fermentó el agar manitol salado..	29
Figura 2-2:	Preparación de las muestras para el análisis microbiológico.....	32
Figura 3-2:	Recuento bacteriano en placas Petrifilm	33
Figura 4-2:	Siembra del inóculo para antibiograma.....	38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3:	Recuento de Coliformes totales en UFC/mL	42
Gráfico 2-3:	Recuento de <i>Escherichia coli</i> en UFC/mL.....	43
Gráfico 3-3:	Recuento de <i>Aerobios mesófilos</i> en UFC/mL.....	48
Gráfico 4-3:	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en UFC/mL.....	50
Gráfico 5-3:	Porcentaje de resistencia y sensibilidad de <i>Escherichia coli</i> frente a 6 antibióticos.....	53
Gráfico 6-3:	Porcentaje de resistencia y sensibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a 7 antibióticos.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Contaminación de la leche en el interior de la ubre.....	11
Tabla 2-1:	Resumen de las fuentes de contaminación de la leche.....	14
Tabla 3-1:	Límites máximos residuales (LMR) de antimicrobianos en leche....	18
Tabla 1-3:	Nivel de significancia según estadístico de Levene.....	40
Tabla 2-3:	Nivel de significancia del Test de ANOVA de un factor.....	41
Tabla 3-3:	Recuento de microorganismos <i>Coliformes totales</i>	42
Tabla 4-3:	Recuento de <i>Escherichia coli</i>	43
Tabla 5-3:	Prueba del Número más probable de coliformes/mL de muestra.....	45
Tabla 6-3:	Recuento de <i>Aerobios mesófilos</i>	47
Tabla 7-3:	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	50
Tabla 8-3:	Porcentaje de resistencia y sensibilidad de <i>Escherichia coli</i> frente a 6 antibióticos.....	53
Tabla 9-3:	Porcentaje de resistencia y sensibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a 7 antibióticos.....	54

RESUMEN

Se realizó el análisis microbiológico y la resistencia a antibióticos de la leche cruda de bovino expendida en el mercado “San Alfonso” de la ciudad de Riobamba para determinar calidad bacteriológica. La recolección y transporte de siete muestras evaluadas en cada uno de los muestreos se efectuó de acuerdo a lo establecido en la Norma NTE INEN 0004. Los indicadores microbiológicos que se analizaron para determinar la calidad higiénico-sanitaria fueron *Coliformes Totales*, *Escherichia coli*, *Aerobios mesófilos* y *Staphylococcus aureus* por medio de Placas Petrifilm 3M, en el caso de *Coliformes totales* por la técnica del número más probable en tres de las siete muestras, y siembra en agar estándar métodos. Verificando la existencia de los microorganismos de interés por medio de pruebas confirmatorias. El perfil de resistencia antimicrobiana se realizó por el método de difusión en agar según Kirby Bauer. El recuento de *Coliformes totales* sobrepasó los límites máximos permitidos según el Reglamento Técnico RTCR: 401-2006 en el 100% (7/7) de las muestras e igualmente en la determinación del NMP las tres muestras analizadas se encontraron en un rango de 210 a 1100 UFC/mL, siendo mayores al valor establecido (20 NMP/mL). El 42.9% (3/7) de las muestras cumplieron con el parámetro microbiológico para *Escherichia coli*. El 14,28% (1/7) excedió el valor estándar establecido por la norma NTE INEN 0009 (1.5×10^6 UFC/mL) para *Aerobios mesófilos* y el conteo de *Staphylococcus aureus* resultó ser superior al valor de referencia (máximo 500 UFC/mL) oscilando entre 3.000 UFC/mL y 1.326.667 UFC/mL. Las pruebas confirmatorias coincidieron con el crecimiento en placas Petrifilm comprobando así la existencia de los agentes bacterianos. El 40% (2/5) de las muestras en las que se detectó *Escherichia coli* demostró ser resistencia frente a ampicilina y el 20% (1/5) lo fue a kanamicina, estreptomycin y tetraciclina el 100% de las muestras fueron sensibles frente a gentamicina y nitrofurantoína. El 67% (4/6) de las muestras en las que se detectó *Staphylococcus aureus* fue resistente únicamente a penicilina y el 100% de ellas mostraron sensibilidad ante ciprofloxacino, clindamicina, amikacina, tetraciclina, cefoxitin y eritromicina. Se concluyó que la calidad bacteriológica de la de leche cruda comercializada es deficiente, y que los microorganismos presentaron mayor resistencia a los antibióticos ampicilina y penicilina. Se recomienda al Ministerio de Salud, realizar en forma permanente la capacitación y control con personal técnico y capacitado, para proteger la salud pública.

PALABRAS CLAVE: <MERCADO SAN ALFONSO> <RIOBAMBA [CANTON]>
<CHIMBORAZO [PROVINCIA]> <LECHE CRUDA> <MICROORGANISMOS>
<INDICADORES DE CALIDAD HIGIENICO-SANITARIO> <ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO> <ANTIBIOGRAMA> <RESISTENCIA BACTERIANA>

ABSTRACT

A microbiological analysis and testing of antibiotic resistance of raw bovine milk sold the “San Alfonso” market in Riobamba city was carried out in order to determine bacteriological quality. The collection and transportation of the seven samples tested in each of the collected selections was conducted in accordance with the provisions of INEN Norm 0004. The microbiological indicators that were analyzed to determine the sanitary and hygiene quality were: *Total Coliforms*, *Escherichia coli*, *Aerobic mesophilic* and *Staphylococcus aureus* using Petrifilm 3M plates. In the case of *total Coliforms*, the most probable number technique was used on three of the seven samples along with standard method agar plating. The existence of microorganism of interest was verified by confirmatory test. The profile of antimicrobial resistance was performed by the agar diffusion method as according to Kirby Bauer. The *total Coliform* count exceeded the maximum levels permitted according to the Technical Regulation RTCR: 401-2006 IN 100% (seven out of seven) of the samples and also in that determined by the NMP, the three samples tested were in the range of 210 to 1100 CFU/ mL, thus being greater than the set value (20 NMP/mL) 42.9% (three out of seven) of the samples met the microbiological parameter for *Escherichia coli*. 14.28% (one out of seven) exceeded the standard value set by the NTE INEN (1.5×10^6 CFU/mL) for Aerobic mesophilic bacteria. The *Staphylococcus aureus* count turned out to be higher than the reference value (maximum 500 CFU/mL) ranging between 3.000 CFU/mL and 1.326.667 CFU/mL. Confirmatory tests coincided with the growth in Petrifilm plates thus substantiating the existence of bacterial agents. In 40% (two out of five) of the samples where *Escherichia coli* was detected, resistance to ampicillin was demonstrated and 20% (one out of five) showed resistance to kanamycin, streptomycin and tetracycline. 100% of the samples in which *Staphylococcus aureus* was detected were resistant only to penicillin and 100% of them were sensitive to ciprofloxacin, clindamycin, amikacin, tetracycline, cefoxitin and erythromycin. It was concluded that the bacteriological quality of raw milk being sold is deficient, and that the microorganism showed high resistance to ampicillin and penicillin antibiotics. It is recommended to the Ministry of Health to develop a permanent ongoing training and control using technical and trained staff to protect public health.

KEY WORDS: <SAN ALFONSO MARKET> <RIOBAMBA [CANTON]> <CHIMBORAZO [PROVINCE]> <RAW MILK> <MICROORGANISMS> <SANITARY-HYGIENE QUALITY INDICATORS> <MICROBIOLOGICAL ANALYSIS> <ANTIBIOGRAM> <BACTERIAL RESISTANCE>

INTRODUCCIÓN

La leche es el alimento más completo consumido por el hombre al proporcionarle beneficios nutricionales debido a su composición química rica en proteínas, ácidos grasos, inmunoglobulinas y micronutrientes, lo cual a la vez la convierte en un producto perecedero y susceptible para transmitir enfermedades debido a la capacidad de albergar microorganismos o contaminantes como hormonas, plaguicidas, antibióticos y otros medicamentos veterinarios. (Máttar et al., 2009: 580)

La FDA expresa que de acuerdo con el análisis realizado por los centros para el control y prevención de enfermedades entre 1993 y 2006 se enfermaron más de 1500 personas en Estados Unidos por ingerir leche cruda. Además informó que la leche no pasteurizada tiene 150 veces mayor probabilidad de provocar Enfermedades Transmitidas por Alimentos y genera 13 veces más hospitalizaciones que aquellas enfermedades ocasionadas por productos lácteos pasteurizados.

La necesidad de un apropiado manejo sanitario en el ganado lechero engloba una serie de actividades dentro de las cuales se manifiesta la prevención, control y manejo de enfermedades infecciosas de origen bacteriano las cuales provocan disminución en la producción y calidad de la leche cruda; obteniéndose pérdidas a nivel económico, por lo que el productor opta por aplicar un tratamiento terapéutico para que el estado de salud del animal mejore, siendo una de las alternativas más viables la terapia con antibióticos puesto que muchos de estos medicamentos son de venta libre, costo accesible y de fácil aplicación, es así que el ganadero puede llegar a sobrepasar los niveles permisibles o hacer uso del antibiótico por repetidas ocasiones, lo cual constituye un factor negativo para la salud de la población al existir el riesgo de transmisión de bacterias antibiótico-resistentes al hombre por medio del consumo de leche cruda. (Faría et al, 2005: p. 64; Aponte, 2007: p.20)

Ecuador en el año 2013 obtuvo una producción total de 6'262.408 litros de leche de los cuales 4'534.776 litros se destinaron a venta en líquido del alimento, aportando la provincia de Chimborazo con 573.035 litros del volumen de producción, de tal cantidad en la presente provincia se comercializó 484.763 litros de leche en líquido. Por lo tanto es notable que un alto volumen de leche producida en el sector está destinado al consumo y uso de la población Chimboracense (INEC, 2013, www.ecuadorencifras.gob.ec). Además es necesario mencionar que a nivel nacional el mayor volumen de leche originada de animales enfermos o en tratamiento se descarta, sin embargo el 11,61% es consumido, cifra que indica que algunos de

los productores de leche no practican el retiro del alimento proveniente de animales que se encuentran bajo tratamiento ya que no existe un control correcto por parte de las autoridades encargadas, lo cual podría estar ejerciendo presión selectiva hacia la presencia de bacterias patógenas antibiótico-resistentes que se transmiten genéticamente entre microorganismos y también a las personas por medio de la ingesta del alimento. (Aponte, 2007: p.20)

Debido a la alta demanda que presenta este alimento es importante que durante toda su cadena alimentaria se apliquen medidas higiénicas y sanitarias establecidas por la región y el país para ofrecer un producto de calidad apto para el consumo humano y evitar que éste sea el causante de enfermedades transmitidas por los alimentos o el que provoque resistencia a antibióticos en el ser humano. Sin embargo y pese a que existen guías que permiten aplicar métodos modernos e higiénicos que garanticen la salubridad de la leche así como la práctica de una correcta sanidad del animal, no todas las personas del sector lechero dedicadas a la producción y expendió cumplen con los requisitos establecidos en normas nacionales e internacionales vigentes debido a la influencia de factores como son la falta de información sobre el cuidado e higiene de los animales, poca cultura en prácticas de higiene, ausencia de capacitación en las buenas prácticas de ordeño, manipulación, almacenamiento, transporte y distribución, insuficientes recursos económicos que le permitan acceder a maquinaria apropiada así como a infraestructura adecuada, entre otras.

Por todo lo anteriormente mencionado y en base a lo emitido por la OMS al manifestar que la inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos así como a leyes, normas y reglamentos nacionales e internacionales que respaldan la garantía de la inocuidad que debe presentar todo alimento, así como a la existencia de la venta clandestina del alimento pese a que las autoridades del Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de Riobamba han prohibido su expendio, existe la necesidad de reunir evidencias que permitan clarificar la calidad microbiológica y cuantificar la resistencia de microorganismos patógenos frente a los antibióticos en la leche cruda expendida a las personas que la consumen directamente o la emplean como materia prima para la elaboración de productos derivados, por ello es necesario la realización de un análisis microbiológico y perfil de resistencia antimicrobiana en el alimento que nos permita conocer el nivel de aplicación de medidas higiénico-sanitarias empleadas desde el ordeño hasta el momento que llega al lugar de comercialización y en base a los resultados obtenidos determinar su calidad e inocuidad.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Definiciones de leche y leche cruda

1.1.1. Leche

“Producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada a un tratamiento posterior previo a su consumo”. (Norma NTE INEN 9, 2012)

1.1.2. Leche cruda

“Leche que no ha sido sometida a ningún tipo de calentamiento, es decir su temperatura no ha superado la de la leche inmediatamente después de ser extraída de la ubre (no más de 40°C)”. (Norma NTE INEN 9, 2012)

1.2. Síntesis y secreción de leche cruda

La etapa inicial de síntesis y secreción se conoce como lactogénesis, dándose lugar en las células epiteliales glandulares de los acinis de la glándula mamaria. Esta actividad secretora depende de un complejo hormonal lactógeno (prolactina, hormona del crecimiento y hormona placentaria lactógena) originado en el lóbulo anterior de la hipófisis debido a un estímulo nervioso mamario. Este complejo actúa únicamente cuando las concentraciones de progesterona y foliculina descienden considerablemente. (Caravaca, et al, 2005: p.120)

La fase en la cual la leche almacenada en la glándula mamaria por horas o máximo un día se excreta al exterior, es conocida como eyección y se produce por el ordeño o la acción de mamar. La hormona que interviene en este proceso es la oxitocina que resulta de un reflejo nervioso de origen mamario en presencia de estímulos favorables. La función de esta hormona es provocar

la contracción de las células mioepiteliales que rodean a los alveolos y así se da lugar a la expulsión o bajada de la leche a través de conductos y cisternas. (Alais, 1998: p.25)

1.3. Composición química de la leche cruda

Sus componentes presentan variación en dependencia de la raza, edad, época del año, alimentación, sistema de ordeño, período de lactación y otros factores. (Consumer: <http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/guia-alimentos/leche-y-derivados/2001/08/06/38377.php>)

Los principales componentes de la leche se expresan en valores medios por litro de leche.

- Agua: 875g
- Carbohidratos: 48g
Lactosa: 48g
- Materia Grasa: 36g
Lípidos simples: 35g
Fosfolípidos: 0.5g
Sustancias liposolubles insaponificables: 0.5g
- Sustancias nitrogenadas: 33g
Proteínas: 31.4 g
Sustancias no proteicas: 1.6 g
- Minerales: 9g (Castillo y Mestres, 2004: pp. 20-31)

1.4. Valor nutricional

La leche aporta una cantidad importante de proteínas de elevada digestibilidad y valor biológico necesarios para cubrir los requerimientos humanos al contribuir con aminoácidos esenciales especialmente lisina la cual aumenta el valor biológico de otras proteínas de menor calidad, su contenido en caseína favorece la absorción y biodisponibilidad del calcio. Otras proteínas séricas como la alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina, inmunoglobulinas, proteosomas-peptonas y otras presentan propiedades bacteriostáticas de interés en la prevención de enfermedades en el recién nacido. (Hernández y Sastre, 1999, pp. 377-378; Gil, 2010: pp.11-13)

En la composición de los lípidos figura junto a los triglicéridos otros lípidos simples los monoglicéridos y diglicéridos, ésteres de colesterol y ceras así como también lípidos

insaponificables siendo el más importante el colesterol, pigmentos, vitaminas A, D y E así como antioxidantes y escualeno.

La grasa láctea contiene importantes cantidades de ácidos grasos de cadena corta y media lo que facilita su digestibilidad, sin embargo posee un elevado contenido en ácidos grasos saturados los cuales representan las dos terceras partes del total de ácidos grasos. Un importante papel desempeñado por el ácido linoleico, linolénico y araquidónico es el ser precursores de prostaglandinas. Los lípidos aportan el 50% del valor energético total. Dentro del grupo de los glúcidos destaca la lactosa, azúcar que brinda energía y participa en la absorción intestinal de calcio y otros minerales. Este disacárido constituye la mayor fracción del extracto seco de la leche y la más lábil frente a la acción microbiana, convirtiéndose en ácido láctico responsable del sabor ácido del alimento. (Hernández y Sastre, 1999: pp. 377-378; Gil, 2010: pp.11-13)

Aporta una cantidad importante de calcio convirtiéndola en la principal fuente de obtención de este mineral y gracias a su composición en nutrientes permite una ideal absorción del mismo. Otros minerales que se encuentran son fósforo, zinc, sodio, potasio, yodo, selenio y cromo. (Hernández y Sastre, 1999: pp. 377-378; Gil, 2010: pp.11-13)

Un gran porcentaje de ingesta diaria recomendada de minerales se cubre al consumir leche debido a que otorga cantidades importantes de vitamina B12, riboflavina, vitamina A, niacina y piridoxina principalmente. (Hernández y Sastre, 1999: pp. 377-378; Gil, 2010: pp.11-13)

1.5. La leche como sustrato bacteriano

En la leche proliferan una serie de microorganismos, predominantemente bacterias que modifican sus propiedades dependiendo del tipo de bacteria y el tiempo de duración en el alimento. El crecimiento bacteriano y su acción en la leche produce efectos positivos como en la elaboración de productos fermentados (queso, yogurt, crema ácida, kéfir) o un efecto negativo (alteración, desarrollo de patógenos, formación de toxinas). La interacción entre las bacterias influye en el entorno y éste determina que bacterias crecerán. El medio ambiente incluye las propiedades del sustrato y las condiciones externas, de las que la temperatura constituye la variable más importante.

La leche cruda que se deja estar en contacto con el mundo exterior es esencialmente un ecosistema abierto ya que en ella pueden encontrarse casi cualquier bacteria y son las propiedades de la leche y en gran parte la temperatura las que determinan que bacterias sobrepasarán a las demás. No sólo son importantes las especies y número de bacterias sino

además sus condiciones fisiológicas como la fase de crecimiento o adaptación a la leche y la posible presencia de bacteriófagos.

La leche contiene tan amplio rango de nutrientes, incluidas todas las vitaminas, que son numerosas las especies bacterianas que encuentran en ella suficiente materia prima para la fermentación y el desarrollo; el resultado es bien conocido: la leche cruda se altera rápidamente a temperatura ambiente. (Walstra, 1984: pp. 182-183)

1.6. Microorganismos presentes en la leche cruda

La leche debido a su compleja composición bioquímica, alto contenido en agua y pH cercano a la neutralidad es considerada un buen sustrato para la proliferación de microorganismos saprofitos y también patógenos. (HEER:

<http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/tecnologialeche/informacion/microbiologia.pdf>)

Bacterias

Dentro de este grupo los géneros bacterianos de mayor relevancia son bacterias Lácticas y Coliformes.

❖ Bacterias Gram positivas

Bacterias Lácticas

Son gram positivas, con forma bacilar, cocoide u ovoide, no esporuladas, catalasa negativa, mesófilas, termófilas, anaerobias facultativas, homofermentativas o heterofermentativas. El medio en el que se desarrollan debe poseer un pH 4, alto contenido en carbohidratos y poco oxígeno. (UNSA: <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/14%20leche%20y%20derivados.pdf>)

Presentan importancia tecnológica ya que otorgan textura y establecen las condiciones requeridas para la elaboración de productos lácteos como el yogurt o queso. Además de brindar características organolépticas deseables a la mantequilla o crema y alargar la vida útil de un producto fabricado con sus cultivos. (Celis y Juaréz, 2009: p. 19)

Otro de los beneficios evidenciados es el de poseer propiedades probióticas favorables para la salud y propiedades terapéuticas al aumentar la disponibilidad, digestibilidad, y asimilación de

nutrientes, disminuir los niveles de colesterol. Las bacterias del ácido láctico y sus metabolitos presentan propiedades anticancerígenas.

(UNSA: <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/14%20leche%20y%20derivados.pdf>)

Micrococcus

Poseen una débil capacidad de fermentación, constituyen la flora más abundante en la leche cruda de carácter inocuo, por lo tanto son de muy poca importancia como agentes de adulteración en el alimento crudo. (Celis y Juaréz, 2009: p.14)

Estafilococos

Anaerobios facultativos potentemente fermentadores con importancia en el ámbito sanitario, provocan mastitis e intoxicaciones humanas. La especie *Staphylococcus aureus* al producir su exotoxina termoresistente causa fuertes trastornos intestinales en el hombre y *Staphylococcus epidermidis* puede ser el causante de mastitis. (Celis y Juaréz, 2009: p.14)

Bacterias esporuladas

Representadas por bacilos aerobios que producen proteólisis, acidificación o coagulación y clostridium son anaerobios estrictos generadores de gas y algunos producen toxinas patógenas como el *Clostridium botulinum* Son resistentes al proceso de pasteurización por su capacidad de producir esporas. (Celis y Juaréz, 2009: p.14)

❖ Bacterias Gram negativas

Enterobacterias

Agentes que habitan normalmente en el intestino de los mamíferos por ello al estar presentes en la leche indican contaminación fecal. Las más comunes encontradas en productos lácteos son las del grupo coliforme.

Presentan importancia desde el punto de vista higiénico puesto que algunas dañinas como *Salmonella*, *Yersenia*, *E.coli*, *Shigella* son las responsables de trastornos gastrointestinales y desde el aspecto tecnológico son bacterias heterofermentativas que alteran la leche. (Celis y Juaréz, 2009: p.15)

Acromobacterias

Saprófitas aerobias productoras de variables pigmentos que van de color amarillo al naranja y pueden generar también coloraciones anormales. Poseen la capacidad de generar viscosidad en la leche. (Celis y Juaréz, 2009: p.15)

Pseudomonas

Bacilos gramnegativos, inmóviles, sensibles al calor, requieren una alta actividad de agua y necesitan suficiente cantidad de oxígeno para su crecimiento. Forman parte de la microflora psicrófila y por su capacidad de emplear compuestos carbonatados diferentes de los hidratos de carbono, producir sustancias que influyen negativamente en el sabor, emplear alimentos nitrogenados sencillos, sintetizar sus propias vitaminas o factores de crecimiento, entre otras propiedades son importantes en los alimentos. (Celis y Juaréz, 2009: p.15)

Brucella

Microorganismo patógeno encargado de producir brucelosis. Las especies responsables de la enfermedad son *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis*. (Celis y Juaréz, 2009: p.16)

Levaduras y hongos

Al estar presentes en la leche indican que sus condiciones higiénico-sanitarias son deficientes. Algunas especies producen enzimas lipolíticas y proteolíticas que producen deterioro en el alimento o sus derivados, mientras que otras presentan importancia en la industria láctea al ser utilizadas como cultivos lácteos para el afinado de quesos maduros. (Heer, 2007: p.18)

Son las causantes de que la leche cruda presente aspecto espumosa por la acción de fermentaciones alcohólicas gaseosas. (Celis y Juaréz, 2009: p.16)

Virus

Los principales virus que pueden contaminar la leche son aquellos causantes de fiebre aftosa o estomatitis vesicular. Los bacteriófagos infectan a las bacterias causando su muerte lo cual puede afectar al proceso de producción de derivados lácteos produciéndose la lisis de los cultivos añadidos para generar aroma y sabor. (Celis y Juaréz, 2009)

1.7. Peligros de la leche cruda

La leche cruda y sus derivados pueden ser huéspedes de microorganismos peligrosos que se transmiten al hombre en el momento que los ingiera y representa graves riesgos para la salud de la comunidad. El grupo poblacional que más se podría encontrar afectado está integrado por niños, mujeres embarazadas, adultos mayores, personas que toman antibióticos, antiácidos, corticoides o posean enfermedades crónicas e individuos con sistemas inmunitarios debilitados. (FDA: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM316383.pdf>)

- La leche cruda y productos lácteos elaborados a partir de ella se consideran productos con leche que no ha sido sometida a algún tratamiento por lo que no son tan seguros como los provenientes de leche pasteurizada.
- Son inherentemente inseguros para los consumidores porque pueden contener uno o más tipos de bacterias que pueden causar enfermedades tanto leves como graves. Estas bacterias perjudiciales incluyen *Brucella*, *Campylobacter*, productos de toxina Shiga, *E coli* O157:H7, *Listeria*, *Mycobacterium bovis*, *Salmonella* y *Yersinia*.
- Las infecciones a causa de consumir estos productos lácteos presenta síntomas como: vómito, diarrea, dolor abdominal, fiebre, calambres de estómago, dolor de cabeza o dolor corporal. Raramente se presenta una severa enfermedad provocada por la bacteria *Campylobacter jejuni* como es la neurológica denominada síndrome de Guillain-Barré, al infectarse con *Listeria monocytogenes* puede presentarse muerte fetal o aborto involuntario en mujeres en estado de gestación y en niños o ancianos insuficiencia renal debido a *E. coli* O157: H7.

(CDPH: <https://www.cdph.ca.gov/HealthInfo/discond/Documents/RawMilkFact%20SheetSpanish.pdf>)

1.8. Razones de consumo de leche cruda

La población prefiere consumirla porque señala que:

- ❖ Es mejor comer alimentos naturales, orgánicos y poco procesados.
- ❖ La leche cruda contiene mayor cantidad de algunos nutrientes que la leche pasteurizada.
- ❖ Es un alimento que posee la capacidad de prevenir y hasta curar muchos problemas de salud como el asma, diabetes, alergias, cáncer, autismo e intolerancia a la lactosa.
- ❖ Considera una forma de apoyar a los agricultores locales y la agricultura sostenible.
- ❖ La falta de acceso a adquirir leche pasteurizada por vivir en zonas rurales. (Barton; Rimón)

1.9. Contaminación de leche cruda

La presencia principalmente de contaminantes químicos y biológicos en la leche cruda establecen su calidad.

1.9.1. Contaminantes químicos

Derivan del medio que rodea a la leche desde su extracción de la glándula mamaria hasta su destino final. (Celis y Juaréz, 2009: p.12)

Los contaminantes químicos a los que se encuentra expuesto el bovino e indirectamente su leche pueden ser metales pesados, bifenilos policlorados, furanos, dioxinas o hidrocarburos aromáticos policlorados. También puede verse afectada con residuos farmacológicos originados de medicamentos veterinarios aplicados al animal, con restos de toxinas o plaguicidas presentes en el agua, pasto o pienso con que son alimentados.

Durante las etapas de ordeño, almacenamiento, transporte, distribución o comercialización la inocuidad de la leche se encuentra en riesgo por el uso de detergentes y desinfectantes en procesos de limpieza y desinfección al existir transferencia de los materiales en contacto con el alimento y por una posible adulteración con sustancias prohibidas por la regulación.

Medicamentos veterinarios: se administran al animal destinado a la producción de alimentos con fines terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o son útiles para cambiar funciones fisiológicas o de comportamiento. Dentro de este grupo suelen tener relevancia los residuos de antibióticos que se administran a los animales sin el necesario período de espera. La administración directamente a la glándula mamaria parece ser la vía más implicada en la presencia de residuos de antibióticos en la leche. Otros residuos farmacológicos hallados en la leche incluyen antiparasitarios, antiinflamatorios, promotores del crecimiento, ayudantes de producción, entre otros. (INS: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-peligros-quimicos-en-leche.pdf>)

Plaguicidas: productos químicos empleados para combatir plagas que son vectores de enfermedades transmisibles o afectan las cosechas. Son considerados biocidas con algún grado de toxicidad para los seres humanos lo cual ha provocado preocupación debido al uso generalizado e indiscriminado de estos productos.

(INS: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-peligros-quimicos-en-leche.pdf>)

Contaminantes ambientales: dentro de esta categoría se encuentran los metales pesados, dioxinas, furanos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y bifenilos policlorados, que son de origen natural o el producto de actividades antropogénicas. Las concentraciones ambientales elevadas y su persistencia en el ambiente hace que estos contaminantes lleguen a los pastos y a través de ellos a los animales, llegando al ser humano por medio de su dieta basada en productos lácteos. (INS: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-peligros-quimicos-en-leche.pdf>)

Micotoxinas: los considerados metabolitos secundarios tóxicos producidos por determinados mohos que frecuentemente se presentan en la leche son las aflatoxinas, fumonisinas, zerealenona, tricoticonos y ergot alcaloides.

La excreción de micotoxinas en la leche es baja, presentándose cuando existen cambios en la barrera sangre-leche ya sea por infecciones sistémicas y locales o cuando la flora del rumen se afecta por enfermedades metabólicas, lo que permite el ingreso inesperado de toxinas no metabolizadas. (INS: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-peligros-quimicos-en-leche.pdf>; Roig, 2004)

1.9.2. Contaminantes biológicos

Dentro de este grupo se encuentran agentes microbianos que pueden afectar a la leche desde el instante de su producción. Su presencia depende básicamente de las prácticas de higiene y sanidad observadas en su manipulación durante su obtención, transporte y venta. (Celis y Juaréz, 2009)

Este tipo de contaminación puede tener dos orígenes diferentes:

Contaminación interna: posee un origen intrínseco en el estado del animal y su ubre, la cual puede adquirirse mediante dos tipos de vías:

✓ **Vía ascendente:** la anatomía de la ubre de la vaca al encontrarse constituida por conductos gruesos y poco ramificados hace más fácil el ingreso post-ordeño de microorganismos que se adhieren a la piel de la ubre (*Staphylococcus aureus*, Streptococcus, Coliformes) por vía ascendente a través del esfínter del pezón al interior del animal independientemente de que se trate de una vaca sana y el ordeño se efectúe en las mejores condiciones asépticas. (Celis y Juaréz, 2009: p.12 ; Agroindustria: <https://agroindustriacurc.files.wordpress.com/2011/09/fuentes-de-contaminacion-de-la-leche-cruda.pdf>)

Cuando las glándulas mamarias están infectadas existen los llamados microorganismos mastíticos entre los que se encuentra *Corinebacterium pyogenes*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* láctico.

✓ **Vía descendente:** conocida también como endógena o hematógena ya que los microorganismos que infectan la ubre provienen de la sangre y poseen la capacidad de movilizarse a través de este fluido o por los capilares mamarios provocando una enfermedad sistémica como es la tuberculosis causada por *Mycobacterium tuberculosis* muy termoresistente y capaz de soportar medios ácidos. También puede hallarse la Brucellosis por presencia de *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* responsables de provocar brucelosis en el hombre y abortos en las vacas.

(Celis y Juárez, 2009: pp.12-13 ; Agroindustria: <https://agroindustriacurc.files.wordpress.com/2011/09/fuentes-de-contaminacion-de-la-leche-cruda.pdf>)

Tabla 1-1: Contaminación de la leche en el interior de la ubre

Etapa del ordeño	Cantidad de gérmenes/mL
Inicio	6.500
Mitad	1.350
Final	709

Realizado por: Jennifer Lluquín
Fuente: Heer J, 2007

Contaminación externa: los factores extrínsecos responsable de este tipo de contaminación poseen múltiples orígenes.

Animal: las ubres pueden acoger por su superficie externa un gran número de microorganismos provenientes de la suciedad como el estiércol en el forraje y en el pelo del animal. Por lo que resulta de vital importancia mantener una limpieza correcta de las ubres y ejecutar buenas prácticas en el ordeño. Además de observar continuamente la salud de la vaca pues al sufrir infecciones puede contener y transmitir agentes patógenos realmente dañinos. (Aguhob y Axtell, 1998)

Equipos y utensilios: los recipientes empleados en el ordeño y los filtros si no son debidamente lavados y desinfectados después de cada uso acumulan microorganismos de descomposición. Los equipos cuyo diseño no es liso y contiene juntas y ángulos resultan muy complicados de limpiar, otorgando un lugar propicio para el desarrollo de microorganismos. (Aguhob y Axtell, 1998)

El ordeñador: desempeña un rol importante en el control de los niveles sanitarios, por lo tanto debe asegurar el mantenimiento de pulcritud en las instalaciones, equipos y utensilios así como la conservación de una adecuada higiene personal y un apropiado estado de salud, sin olvidar el cuidado de los animales para que permanezca saludables y limpios.

Si no se controla lo antes expuesto puede aparecer contaminación al pasar de un animal a otro lo cual resultará en la pérdida de calidad higiénica de la leche que se ha producido calificándola no apta para el consumo humano. (Aguhob y Axtell, 1998)

Se ha señalado al ordeñador como el responsable de la contaminación de la leche con microorganismos patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Leptospiras*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus*, etc). (<https://materiasprimaspecuariasmyblog.files.wordpress.com/2010/07/material-micro-leche.doc>)

Ambiente: al interior como exterior del lugar donde se lleva a cabo el ordeño el ambiente incide en los niveles de contaminación registrados en la leche. Presentándose un mayor riesgo dentro de los establos debido a la presencia del aire e insectos (moscas) que pululan en el lugar, por lo que preferiblemente se recomienda que la extracción de la leche se ejecute en un lugar especial o en el pastizal teniendo la precaución de que los recipientes de su recolección permanezcan cubiertos. (Aguhob y Axtell, 1998)

Suministro de agua: al no contar con agua de calidad requerida para la limpieza de las ubres del animal, higiene personal o lavado de recipientes, utensilios y equipos necesarios, las consecuencias pueden ser graves considerando que el empleo de agua contaminada puede contener bacterias peligrosas para la salud de sus consumidores como es el caso de los coliformes que causan desórdenes estomacales e inclusive puede presentarse la enfermedad del cólera. (Aguhob y Axtell, 1998)

Almacenamiento y transporte: para la correcta conservación de la leche recién ordeñada se debe controlar principalmente dos factores tiempo-temperatura, por lo cual es recomendable enfriar la leche a 4°C dentro de las dos primeras horas posteriores al ordeño y durante el transporte es fundamental mantener la cadena de frío puesto que el alimento debe llegar al centro de acopio o local de almacenamiento con una carga microbiana en un rango de 500 a 10000 UFC x mL⁻¹. (Magariños, 2000; Reyes, 2010)

Tabla 2-1: Resumen de las fuentes de contaminación de la leche

Fuente de contaminación	Cantidad de bacterias (UFC/mL)
Aire	100-1.500
Ubre	300-4.000
Piel de pezones	500-15.000
Infecciones de la ubre	300-25.000
Equipamiento	Miles-millones

Realizado por: Jennifer Lluquín

Fuente: Heer G, 2007.

1.10. Calidad de la leche cruda

Se trata del grado en el que la leche cumple con los parámetros físico-químicos, organolépticos y microbiológicos establecidos en normas vigentes. (Vargas, http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/xcongreso/P297_CalidadLeche.pdf)

Las cualidades nutritivas que brinda la leche son incuestionables, sin embargo desde el momento en que este alimento sale al exterior de la glándula mamaria hasta cuando llega al consumidor se encuentra sometido a diversos riesgos que alteran su calidad original.

Los peligros a los que se encuentra expuesta son la contaminación y proliferación microbiana, presencia de gérmenes patógenos, cambio de sus características físicas y químicas, alteración organoléptica y contaminación con sustancias químicas. Por lo cual ya sea de manera aislada o conjuntamente estos contaminantes inciden de forma negativa sobre la calidad higiénica o su composición, en consecuencia se ven afectadas la salud pública y economía de un país. (Reyes et al., 2010)

1.11. Calidad microbiológica

Se establece de acuerdo a la concentración de las bacterias de la leche, presencia de microorganismos patógenos, de residuos de antibióticos y medicamentos que afectan tanto los procesos de transformación de la leche como la salud humana. (Calderón, et al., 2006)

La calidad microbiológica está basada principalmente en dos aspectos fundamentales: la calidad higiénico-sanitaria y la calidad comercial.

1.11.1 Calidad higiénica de la leche cruda e indicadores microbiológicos

Condición que hace referencia al nivel de higiene por medio del cual se obtiene y manipula el alimento. Se relaciona con el contenido de microorganismos presentes en la leche cruda el cual se transfiere en una cantidad significativa a los productos elaborados a partir de ella. La carga

microbiana incide representativamente en la vida útil tanto de la materia prima, producto terminado e inocuidad de los mismos.

(Heer, 2007, <http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/tecnologialeche/informacion/microbiologia.pdf>)

Existen grupos de microorganismos que son considerados como indicadores en la Industria Láctea, debido a que su presencia permite comprobar el cumplimiento de la aplicación de las buenas prácticas higiénicas.

La presencia de estos grupos microbianos en la leche señala que el producto estuvo expuesto a condiciones que dieron lugar al ingreso de organismos peligrosos o permitieron la multiplicación de especies infecciosas o toxigénicas. (Analiza calidad: <http://www.analizacalidad.com/docftp/fi168arf2005-1.pdf>)

Los grupos de microorganismos indicadores se exponen a continuación:

1.11.1.1. Bacterias Aerobios mesófilos

Microorganismos desarrollados en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una temperatura óptima de 30°C a 40°C. (NTE INEN 1529-5, 2006)

Por medio del recuento de microorganismos aerobios mesófilos se estima la microflora total sin especificación de los tipos de microorganismos o quizás se indica una alteración incipiente del alimento y no un peligro potencial para la salud del consumidor.

Altos recuentos de la bacteria posee diversos significados:

- Materia prima altamente contaminada.
- Incorrectos métodos de manipulación en el proceso de elaboración de productos.
- La posibilidad de existir patógenos.
- Signo de inmediata descomposición al presentar tasas superiores a 10⁶-10⁷ gérmenes por gramo o mL del alimento. (Pascual y Calderón, 2000: p.13)

1.11.1.2. Bacterias entéricas

- ***Coliformes totales***

Comprende diversas especies pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados. Su importante característica es la

de tener la capacidad para fermentar la lactosa produciendo ácido y gas en un período de tiempo de 48 horas. (ANMAT: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/Guia_de_interpretacion_resultados_microbiologicos.pdf)

La mayoría de ellos están presentes en la flora normal del tracto digestivo de los humanos y animales por lo que son eliminados principalmente en las heces, también pueden encontrarse en el suelo, agua, semillas y alimentos crudos (leche, carne, vegetales). (Camacho A, et al., 2009)

La determinación es llevada a cabo ampliamente en la microbiología de alimentos como indicador de prácticas higiénicas inapropiadas durante el manejo, fabricación o contaminación post-proceso térmico. (NTE INEN 1529-2, 1999)

- ***Escherichia coli***

Bacteria que habita en el tracto intestinal del hombre y los animales vertebrados. Se puede multiplicar en una temperatura entre 6 y 50°C siendo la óptimo una temperatura de 37°C. Existen cepas inocuas pero otras son consideradas patógenas debido a la producción de verotoxinas que ponen en riesgo la salud del individuo al provocar infecciones gastrointestinales. (Tortora, et al., 2007)

Al encontrarse en los alimentos o el agua es indicativo de contaminación directa o indirecta de origen fecal debido a un incorrecto manejo y almacenamiento insalubre de alimentos. (<http://www.analizacalidad.com/docftp/fi168arf2005-1.pdf>)

1.11.1.3 Otros microorganismos indicadores

- ***Staphylococcus aureus***

Coco gram positivo, se agrupa en racimos por dividirse en más de un plano, inmóviles, anaerobios facultativos, coagulasa y desoxirribonucleasa positivos. La temperatura a la que crece se encuentra en un rango de 7 a 48°C siendo la óptima de 37°C. (NTE INEN 1529-8, 1990)

Son microorganismo productores de exotoxinas las cuales pueden producirse en el alimento y permanecer en el aun cuando haya sido sometido a tratamiento térmico pues son toxinas resistentes al calor.

La fuente de *Staphylococcus aureus* es múltiple al encontrarse en la piel, tracto nasofaríngeo, heridas, ojos y tracto intestinal del hombre, además puede hallarse en el suelo, aire y productos lácteos. (Gil, 2010: p. 14)

La determinación de estos microorganismos indica una deficiente sanitización durante la manipulación del alimento o un inadecuado control de temperatura en el proceso de tratamiento. (MAG, 2011: p. 46)

1.12. Uso de antibióticos en ganadería lechera

Los propósitos por los que se administran antibióticos en vacas productoras de leche son:

1. Tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por diversos microorganismos entre las que se menciona a aquellas que afectan a las mamas, infecciones podales, pulmonía, podofilitis, entre otras.
2. Prevención de enfermedades infecciosas al incluir fármacos antibacterianos en el alimento del bovino.
3. Estimulantes del crecimiento, empleándose concentraciones subterapéuticas por un período prolongado con el fin de mejorar la conversión del alimento o promover el crecimiento del animal. (Bogio, 2010: pp. 1-3)

Los antibióticos empleados con mayor frecuencia en la ganadería lechera bovina pertenecen a los siguientes grupos: betalactámicos dentro del cual está la penicilina que constituye el tratamiento obligado en numerosas enfermedades infecciosas; tetraciclinas; oxitetraciclinas; sulfas; aminoglucósidos como la neomicina y macrólidos como la eritromicina. (Bogio, 2010: pp. 1-3)

Tabla 3-1: Límites máximos residuales (LMR) de antimicrobianos en leche

Antimicrobiano	LMR (ug/kg)
Amoxicilina	4
Ampicilina	4
Bacitracina	100
Bencilpenicilina	4
Ceptiofur	100
Colistín	50
Eritromicina	40
Espectinomisina	200
Espiramicina	200
Dihidroestreptomicina/ Estreptomicina	200
Gentamicina	100
Kanamicina	150
Lincomicina	150
Neomicina	1500
Penicilina G sódica	5
Pirlimicina	100
Sulfadimidina	25
Tetraciclina	100
Tilosina	100
Oxitetraciclina	100

Realizado por: Jennifer Lluquín

Fuente: Comisión del Codex Alimentarius, 2012; Unión Europea, 2010

1.13. Riesgos de la leche con residuos de antibióticos

El consumo de leche con antibióticos no sólo es un peligro para la salud humana y los procesos de industrialización del alimento sino también representa disminución de su costo lo que se refleja en la disminución económica de productores y comerciantes.

El riesgo para el humano se presenta como consecuencia del consumo regular de la leche que aunque contenga pequeñas cantidades de una misma sustancia conlleva al apareamiento de efectos tóxicos directos e indirectos resultado de la acumulación del medicamento en el organismo.

Los efectos tóxicos directos son resultado de la utilización de antibióticos en condiciones terapéuticas, en tanto que los efectos indirectos son los relacionados a los fenómenos de resistencia bacteriana y a las reacciones alérgicas. (Parra, et al., 2003). Además es posible que se presenten otros efectos adversos, tales como disbacteriosis, alteración de la flora intestinal, disminución de la síntesis de vitaminas y desarrollo de microorganismos patógenos. (Máttar, et al., 2009)

1.13.1. Resistencia bacteriana

En 1928 inicia la era de los antibióticos con el descubrimiento de la penicilina por Fleming, lo cual constituyó uno de los logros más importantes del siglo. Es así que empiezan a obtenerse, comercializarse y utilizarse en grandes cantidades los antimicrobianos, pero pronto se manifestó que las bacterias tenían capacidad de desarrollar mecanismos de resistencia evidenciándose que cepas de *Staphylococcus aureus* podían degradar la penicilina y posteriormente mostraron resistencia a la meticilina. (Bogio, 2010; Sussmann, et al., <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>)

Una bacteria muestra sensibilidad frente a un antibiótico cuando el medicamento es eficaz frente a ella y la infección presentada desaparece por muerte o inactivación del microorganismo y es considerado un agente resistente cuando su crecimiento únicamente se inhibe al existir concentraciones mayores a las que el fármaco puede alcanzar en el sitio infeccioso. Por la presión selectiva de los antibióticos las cepas resistentes se hacen predominantes, desapareciendo las bacterias sensibles, lo cual no sólo se presenta en los antibióticos empleados en medicina humana sino también y de manera importante en aquellos utilizados en veterinaria. (Pérez, 1998: p. 58)

La resistencia bacteriana aparece como una consecuencia del mal uso de los antimicrobianos aunque en la mayoría de ocasiones su aparición es inevitable. Es un fenómeno creciente debido a que cada vez es más complicado el control por parte de los antibióticos existentes frente al apareamiento de nuevos mecanismos desarrollados por las bacterias lo cual repercute en implicaciones sociales y económicas debido al aumento de los niveles de morbilidad y mortalidad, incremento en los costos de tratamientos y hospitalizaciones. (Sussmann, et al., <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>)

También es considerado un problema ecológico ya que las cepas resistentes a antimicrobianos pueden ser transferidas no solamente entre bacterias que habitan un determinado animal que se encontró en tratamiento antibiótico, sino que además afecta a poblaciones ubicadas en geografías diferentes, entre poblaciones de animales y el hombre y viceversa, lo que hace más difícil el tratamiento de las infecciones. (Parra, et al., 2003, http://agronet.gov.co/www/docs_si2/20061024154510_control%20estrategico%20residuos%20medicamentos%20en%20la%20leche.pdf; Bogio, 2010).

1.13.1.1 Tipos de resistencia

Resistencia natural: los animales poseen en su flora intestinal y microflora numerosos tipos de bacterias, entre las cuales suele haber especies con resistencia natural para ciertos antibióticos cuya presencia permitirá la reproducción selectiva de esas especies.

Resistencia adquirida: una bacteria sensible a un antibiótico después de un contacto prologado con él puede convertirse en resistente. Para la explicación de este fenómeno se han propuesto dos teorías:

- **Teoría de las mutaciones:** durante la proliferación de microorganismos naturalmente sensibles por mutación espontánea se formaría una pequeña cantidad de variantes resistentes, que se manifiestan en el momento en que la colonia entra en contacto con el medicamento resultando afectadas solamente las bacterias susceptibles.
- **Teoría de la adaptación:** el origen de la resistencia se debe a la adaptación fisiológica por lo que tiene una base citoplasmática y extragenética. (OMS, 1963)

1.13.1.2. Factores que han originado resistencia bacteriana

Entre las variables que han conducido al apareamiento de ese fenómeno se citan:

- ◆ La venta libre de medicamentos para uso terapéutico en animales
- ◆ No consultar a un veterinario con licencia.
- ◆ Empleo general de antimicrobianos en todo tipo de vacas lecheras
- ◆ Uso de dosis incorrectas o el tiempo de duración inadecuado en la terapia antimicrobiana
- ◆ Falta de conocimiento de perfiles de sensibilidad de los diversos gérmenes. (Sussmann, et al., <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>)

1.13.1.3. Mecanismos de resistencia de las bacterias

a. Inactivación del antibiótico por enzimas: las bacterias poseen la capacidad de producir enzimas que inactivan al antibiótico, siendo las principales las betalactamasas. En gram positivos suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares; en gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas.

Hay otras enzimas modificadoras de aminoglucósidos que inactivan la acción de cloranfenicol, tetraciclinas y macrólidos.

b. Modificaciones bacterianas que no permiten que el antibiótico alcance el punto diana: estos microorganismos ocasionan mutaciones en las porinas de la pared celular que bloquean el ingreso de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos). En otras ocasiones se presenta la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activo cuya finalidad es evitar la acumulación en cantidad suficiente para que actúe eficazmente.

c. Alteración por parte de la bacteria de su punto diana: se presentan alteraciones a nivel del ADN girasa (quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) de las proteínas fijadoras de penicilina necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos). (Pérez, 1998: p. 59)

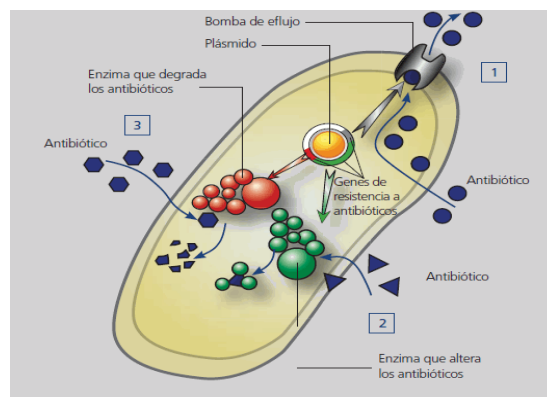


Figura 1-1. Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos
Fuente: Aramayona J, 2015

1.14. Métodos de identificación y confirmación de la presencia microorganismos indicadores en la leche cruda

1.14.1. Placas Petrifilm

Consisten en láminas delgadas con un medio de cultivo y un agente gelificante soluble en agua. Llevan incorporada una película de propileno capaz de atrapar el gas producido por ciertas bacterias. Además contienen indicadores de pH que se encargan de colorear a las colonias para facilitar su identificación y una cuadrícula para poder realizar el conteo de UFC/mL. (Rodríguez, http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act11198.pdf)

Los beneficios que presentan las placas petrifilm para el análisis microbiológico frente a los métodos tradicionales son:

- Resultados de las pruebas consistentes y confiables
- Reducción de tiempo

- Disminución de costos laborales
- Eficiencia mejorada (Placas Petrifilm 3M: <http://www.vectorecuador.com/placas-petrifilm-3m/>)

Las placas que se comercializan se han diseñado para el recuento de bacterias *Coliformes totales*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aerobios mesófilos*, hongos y levaduras.

La muestra a sembrarse en la placa debe ser líquida, diluida y presentar un volumen de 1mL. Su técnica se basa en tres sencillos pasos: inoculación, incubación y lectura e interpretación.

La AOAC Internacional ha reconocido a los métodos de placas Petrifilm como métodos oficiales de análisis. (Placas Petrifilm 3M: <http://www.vectorecuador.com/placas-petrifilm-3m/>)

1.14.2. Agar para Métodos Estándar

Conocido también como Plate Count Agar, es usado para el recuento de bacterias de interés sanitario presentes en agua, leche y otros alimentos que nos permiten determinar la carga microbiana o grado de contaminación. (DIBICO: <http://www.dibico.com/fichast/1020.pdf>)

La formulación del agar la elaboró APHA con el fin de obtener información estandarizada acerca de la población microbiana en un ambiente o material en estudio, proporcionando valores útiles para evaluar su sanidad. (Acumedia: http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7157_PI.pdf)

El medio de cultivo está compuesto por agar (15g/L), peptona de caseína (5g/L) que otorga sustancias como soporte de crecimiento (aminoácidos, compuestos nitrogenados), extracto de levadura (2.5 g/L) que proporciona vitamina B y dextrosa (1g/L) que constituye la fuente de energía. (Acumedia: http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7157_PI.pdf)

1.14.3. Método del Número más probable (NMP)

Se aplica para recuento de *Coliformes totales*, *Coliformes fecales* y cepas gasógenas (aerógenas) de *Escherichia coli*. Está basado en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa por medio de la formación de gas y producción de ácido empleando un medio de cultivo que contiene sales biliares. (UNAM: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Analisis_Agua_NMP_22309.pdf)

El método presenta dos fases, la primera es la prueba presuntiva en la que se emplea el caldo verde bilis brillante que inhibe el crecimiento de bacterias no coliformes. La segunda corresponde a la prueba confirmatoria para la identificación de *Escherichia coli*, se ejecuta a partir de los tubos con caldo verde bilis brillante fermentadores de lactosa, transfiriéndose por inoculación las bacterias a placas de Agar Endo o Agar Eosina Azul de Metileno, obteniendo

resultados positivas cuando las colonias que han crecido presentan un color oscuro con brillo verde metálico. (PAHO: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan/013761/013761-02.pdf>)

1.14.4. Agar Eosina azul de metileno (EMB)

Método diferencial selectivo desarrollado por Levine para el aislamiento e identificación de bacterias gram negativas fermentadoras de lactosa como son las Enterobacterias, puesto que sus colorantes inhiben el crecimiento de bacterias gram positivas. (Prats, 2005: p.30)

Las bacterias que crecen muestran un color violeta más o menos intenso y en el caso de *Escherichia coli* aparece violeta como indicador de lactosa positiva pero con un brillo verde metálico que facilita su detección.

El agar está compuesto por peptona (10 g/L), fosfato dipotásico (2 g/L), lactosa (5 g/L), sacarosa (5 g/L), eosina (0.4 g/L), azul de metileno (0.065 g/L), agar (13.5 g/L). (García, 1997: p.38)

1.14.5. Agar Manitol Salado

Medio altamente selectivo para el aislamiento de estafilococos patógenos en donde las bacterias poseen la capacidad de desarrollarse en presencia de cloruro de sodio al 7.5% y en el caso de la especie *Staphylococcus aureus* fermentar manitol al cambiar de color el indicador rojo fenol presente en el agar y formar un halo amarillo en el medio circundante que es indicativo de producción de ácido a partir de manitol. (BD: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>)

Está compuesto por extracto de carne bovina (1g/L), digerido pancreático de caseína (5g/L), digerido peptídico de tejido animal (5g/L), cloruro sódico (75g/L), D-manitol (10g/L), rojo fenol (0,025 g/L) y agar (15g/L). (BD: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>)

1.14.6. Agar Nutritivo

Sus usos son variados, permite la multiplicación de bacterias poco exigentes, el cultivo y conservación de cepas, determinación de sensibilidad o resistencia a antibióticos, comprobación de la esterilidad, base de medios de cultivo que contengan fluidos corporales o como base de medios de cultivo especiales.

En su formulación está presente extracto de carne (3g/L), peptona de carne (5g/L): siendo estas dos sustancias las fuentes de nitrógeno, vitaminas, carbono y por último el agar-agar (13g/L). (Sagardoy, 2004: p.39)

1.14.7. Tinción de Gram

Es la técnica más utilizada para el examen microscópico de las bacterias, permitiendo clasificar en dos grupos: bacterias Gram positivas capaces de retener el colorante cristal violeta después de un proceso de decoloración con alcohol o éter-acetona y observándose al microscopio bacterias de color violeta o azul oscuro y el segundo grupo corresponde a bacterias Gram negativas que se decoloran y contratiñen con safranina por lo tanto al observarlas al microscopio presentan un color rosado. (Bailey y Scott, 2009: p. 80-81; Hernández, 2002: p. 63-64)

1.15. Antibiograma

Se considera un método fenotípico que permite conocer la sensibilidad *in vitro* de las bacterias frente a los antimicrobianos (antibióticos y quimioterápicos). Se fundamenta en el enfrentamiento de un inóculo bacteriano estandarizado a una única concentración o un rango de concentraciones de un antibiótico determinado. Su realización requiere de la preparación de medios de cultivo siendo el de elección Mueller Hinton y de condiciones apropiadas de incubación. Los resultados obtenidos clasifican a las bacterias en sensibles, moderadamente sensibles y resistentes a un cierto antimicrobiano. (García, 1997: p. 113; Zaragoza, 2007: p. 5)

1.15.1. Descripción de los discos de antibióticos

Los discos empleados son de papel estéril absorbente y contienen concentraciones precisas de los agentes antimicrobianos. Presentan un tamaño de 6.5 mm y se encuentran identificados por medio de un código que comprende de 1 a 3 letras a ambas caras del disco. (Álvarez, et al., 1995: p. 235)

1.15.1.1. Penicilina G

Pertenece al grupo de betalactámicos y se utiliza para investigar la susceptibilidad de todas las penicilinas penicilinasensible, es decir que sus resultados son aplicables a fenoximetilpenicilina, fenoxietilpenicilina (feneticilina) y fenoxipropilpenicilina (propicilina). (Álvarez, et al., 1995: p. 236)

El fármaco está indicado para tratar infecciones de los bovinos por agentes sensibles a penicilina como *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Fusobacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Actinomyces sp.* Por lo tanto se lo recomienda en caso de mastitis, procesos piógenos, edema maligno, pielonefritis, hemoglobinuria bacilar, listeriosis, actinomicosis, tétano y estreptococosis. (http://www.agrytec.com/pecuario/images/stories/auspiciantes.secundarios/ecuaquimica/novartis_ganaderia.pdf)

1.15.1.2. Eritromicina

Antibiótico representante de los macrólidos usado en situaciones en las que existe alergia a penicilina y únicamente se aplica en antibiogramas de bacterias gram positivas.

Se prescribe para tratar infecciones del tracto respiratorio como coriza, sinusitis infecciosa, sinovitis y enteritis específica en ganado porcino, bovino, perros y gatos. (<http://www.ecured.cu/Eritromicina>)

1.15.1.3. Tetraciclina

Sirve para investigar todos los derivados del grupo al ser sus resultados aplicables a clortetraciclina, demeclocina, doxiciclina, metaciclina, oxitetraciclina, minociclina y rolitetraciclina. (Álvarez, et al., 1995: p. 235)

Posee un amplio espectro de actividad frente a bacterias sensibles gram positivas, gram negativas, micoplasmas y espiroquetas. Han demostrado resistencias *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococos*, *Stafilococos* y *Vibriones*.

Se recomienda en bovinos para el tratamiento de enfermedades respiratorias, difteria, enteritis bacteriana, heridas infectadas, metritis aguda, mastitis septicémicas, dematofilosis y en infecciones no específicas o bacterias secundarias. (Rodríguez, 2000: p.75-79)

1.15.1.4. Clindamicina

Derivado clorado de lincomicina que presenta acción bacteriostática contra *Staphylococcus spp.*, *Campylobacter spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Clostridium perfringes* y *Actinomyces spp.*

Indicado para tratar infecciones del tracto respiratorio, actinomicosis, mastitis y enteritis provocada por *E.coli*. (PEV: <http://www.diccionarioveterinariopl.m.com/clindamicina-1545-2>)

1.15.1.5. Ciprofloxacino

Antibiótico empleado en infecciones que afecten al sistema respiratorio, gastrointestinal o urogenital. Muy efectivo para *Mycoplasma spp.*, *Pasteurella spp.*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus spp.* (http://file.biovet.com.br/Bula/Ciprodez/espanhol/bula_ciprodez.pdf)

1.15.1.6. Cefoxitin

Cefalosporina de segunda generación con mayor espectro de acción frente a gérmenes gram negativos sobre todo de *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, y *Proteus spp.*, que sus homólogas de primera generación. Es usada en casos de mastitis e infecciones provocadas por anaerobios. (Castillo y De la Cruz, 2012; Valdovinos y Fabela)

1.15.1.7. Ampicilina

Derivado semisintético del núcleo de la penicilina con amplio espectro, gran capacidad antibacteriana y mayor actividad sobre las bacterias resistentes a los betalactámicos. Es útil para probar hetacilina, amoxicilina, pivampicilina, bacampicilina, talampicilina y metampicilina. (Álvarez, et al., 1995: p. 236)

Se ha indicado en caso en el que bovino presente infecciones gastrointestinales, urinarias, neumonía, mastitis, septicemias, artritis, otitis. *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Actinomices spp.*, *Pasteurella spp.*, *Shigella spp.*, *Klebsiella spp.*, han demostrado ser sensibles al antibiótico. (SANI: http://www.sani.com.ar/producto.php?id_producto=124)

1.15.1.8. Estreptomycin

Fármaco con acción bactericida contra una gran variedad de gérmenes gram positivos y gram negativos causantes de enfermedades como actinomicosis, diarreas por *E.coli* y *Salmonella*, pielonefritis, neumonías, aborto vibrónico o infecciones del cordón umbilical. (IPE: <http://www.veterinarioipe.com.mx/producto/detalle?idp=12142>)

1.15.1.9. Gentamicina

Aminoglicósido muy empleado por su precio y eficacia, recomendado en caso de infecciones bacterianas de la glándula mamaria, útero, septicemias, afecciones articulares o

broncopulmonares, diarreas en bovinos, ovinos, caprinos y equinos. Medicamento eficaz frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Serratia mercens.*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*.

(<http://www.enco.com.ar/productos/2/2/1/25/GENTAMICINA%20Prospectos.pdf>)

1.15.1.10. Kanamicina

Fármaco útil para tratar infecciones provocadas por *E.coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinobacter*. No es un antibiótico de elección para infecciones a causa de estafilococos pero podría utilizarse en ciertas situaciones cuando la infección se origina por un estafilococo conocido o sospechoso. (Vademecum:

<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/k001.htm>)

1.15.1.11. Nitrofurantoína

Nitrofurano sintético usado específicamente para el tratamiento y profilaxis de infecciones del tracto urinario provocadas por bacterias gram negativas o *Enterococcus*. No es considerado un medicamento de elección para este tipo de infecciones ya que no alcanza concentraciones antimicrobianas en sangre. Nitrofurantoína es activa frente a *E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, estafilococos y enterococos. (Cúe y Morejón, 1998,

http://www.bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol14_4_98/mgi09498.htm)

1.16. Descripción del mercado “San Alfonso”

Se encuentra ubicado en el cantón Riobamba, provincia de Chimborazo en las calles Junín y Tarqui, a una altura de 2.754 m.s.n.m. Es uno de los mercados más concurridos en las ferias que se llevan a cabo los días lunes y miércoles con una afluencia del 85%, mientras que el día sábado es copado siendo la afluencia del 100%. Entre los productos que se comercializa en el lugar se encuentran comidas, frituras, bebidas, carnes, pescados, quesos, leche cruda, frutas, verduras, hortalizas, granos, papas y abastos en general. El horario de atención es de domingo a domingo de 7 de la mañana a 7 de la noche aproximadamente. (Robalino, 2009; Diario Los Andes:

<http://www.diariolosandes.com.ec/index.php/noticias/comunidad/9252-el-mercado-san-alfonso-mantiene-su-infraestructura>)



Figura 2-1. Mercado “San Alfonso” de la ciudad de Riobamba
Fuente: <http://www.riobamba-official-tourism-guide.com/sitemap.xml>

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Lugar de la investigación

Las muestras de leche cruda se recolectaron en el mercado “San Alfonso” de la Ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo. (Figura 3-2)



Figura 1-2. Mapa de ubicación del Mercado “San Alfonso”

Fuente: <http://www.ecuador-local.com/riobamba/mercado/mercado-san-alfonso>

El análisis microbiológico y los perfiles de resistencia/sensibilidad se efectuaron en el Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

2.2. Factores de estudio

2.2.1. Población

Leche cruda comercializada en los mercados de la ciudad de Riobamba.

2.2.2. Muestra

Leche cruda comercializada en el mercado “San Alfonso” de la ciudad de Riobamba

2.3. Materiales, Equipos y Reactivos

Materiales

- Cofia, mascarilla, guantes y mandil
- Cooler
- Gel refrigerante
- Frascos de vidrio estériles con tapa rosca
- Marcador permanente
- Puntas azules estériles
- Pipeta automática de 1000 µL
- Tubos de ensayo estériles
- Gradilla
- Parafilm
- Placas Petrifilm 3M para recuento de *Coliformes totales* y *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Aerobios mesófilos*.
- Dispensor para placas Petrifilm
- Probeta
- Balones de aforo
- Matraces Erlenmeyer
- Reverbero
- Lámpara de alcohol
- Cinta indicadora de esterilización
- Franela
- Toallas absorbentes
- Algodón
- Tubos de vidrio estériles
- Tubos Durhan
- Cajas Petri
- Hisopos estériles
- Asa y aguja de inoculación
- Placas portaobjetos
- Discos de antibióticos
- Pinza para discos
- Agua peptonada
- Tego
- Alcohol Potable
- Alcohol Industrial

- Agar Eosina Azul de Metileno
- Agar Estándar Métodos
- Agar Manitol Salado
- Agar Nutritivo
- Agar Mueller Hinton
- Estándar Mac Farland
- Solución salina estéril
- Regla

Equipos

- Balanza
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa bacteriológica
- Refrigerador
- Microscopio

Reactivos

- Agua destilada
- Aceite de inmersión
- Kit para tinción Gram: cristal violeta, lugol, acetona y safranina.

2.4. Metodología

2.4.1. Recolección y transporte de muestras

La recolección y transporte de las muestras se llevó a cabo de acuerdo a la Norma INEN 0004: Leche y productos lácteos. Muestreo.

Para la recolección de las muestras se acudió al mercado “San Alfonso” a las 7:30 de la mañana, recogiendo de cada puesto de venta ambulante un litro de leche cruda, identificándole y transportándole en un cooler con gel refrigerante al Laboratorio de Análisis Bioquímico y Bacteriológico de la ESPOCH, sitio en el cual se procedió inmediatamente a colocar cada litro de leche en frascos de vidrio estériles con tapa rosca de plástico y debidamente identificados; esta actividad se realizó en la cámara de flujo laminar.

2.4.2. Preparación de la suspensión inicial y diluciones

- 1) Homogenizar la leche cruda agitando 25 veces el frasco que contiene la leche cruda durante 10 segundos.
- 2) Tomar 10 ml de la leche y colocar en un frasco estéril de menor volumen.
- 3) Agregar 90 mL del diluyente agua peptonada al 0.01% y mezclar correctamente. Obteniéndose la primera dilución (10^{-1}).
- 4) Transferir con pipeta automática 1 mL de la solución a un tubo de ensayo estéril que contenga 9mL de agua peptonada y proceder a homogenizar, resultando así la dilución 10^{-2} .
- 5) Coger 1 mL de la segunda dilución y colocar en un segundo tubo e igualmente agregar 9 mL de agua peptonada, obteniéndose la tercera dilución (10^{-3}).
- 6) Proceder de la manera expuesta en el paso anterior para obtener la cuarta dilución con la cual se procedió a trabajar. (Figura 4-2). (NTE INEN 1529-2, 1999)



Figura 2-2. Preparación de las muestras para el análisis microbiológico
Fuente: Jennifer Lluquín, 2015

2.4.3. Recuento de bacterias coliformes totales, *Escherichia coli*, *Aerobios mesófilos* y *Staphylococcus aureus* por la técnica de Petrifilm según 3M

- 1) Colocar la placa Petrifilm apropiada y previamente identificada sobre una superficie plana.
- 2) Levantar la película superior y con una pipeta colocada perpendicularmente a la placa, verter 1 mL de la cuarta dilución en el centro del círculo de la película inferior, que contiene el medio deshidratado.
- 3) Deslizar con cuidado la película superior sobre la inferior, tratando de no formar burbujas.
- 4) Inmediatamente después, usando una lámina plástica difusora con la cara plana hacia abajo, distribuir el inóculo sobre el área del medio del cultivo deshidratado realizando presión suave, sólo hasta que la muestra alcance los bordes del círculo.
- 5) Con un movimiento rápido hacia arriba retirar la lámina plástica difusora, evitando giros o deslizamientos horizontales.
- 6) Dejar la placa en reposo por lo menos 1 min para permitir la solidificación del agente gelificante.

- 7) Incubar las placas Petrifilm con la película transparente hacia arriba sin invertir. Se pueden colocar varias placas una sobre otra, en columnas que no excedan 20 unidades.

Coliformes totales: 35°C ± 1°C durante 24 horas ± 2 horas

Escherichia coli: 35°C ± 1°C por 48 horas ± 2 horas

Aerobios mesófilos: 35°C ± 1°C durante 48 horas ± 3 horas

Staphylococcus aureus: 35°C ± 1°C durante 24 horas

- 8) Proceder a la lectura de las placas de acuerdo a la guía de interpretación.
- 9) Efectuar los cálculos correspondientes y expresar los resultados como Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL). (Figura 5-2)



Inoculación



Incubación



Lectura

Figura 3-2. Recuento bacteriano en placas Petrifilm
Fuente: Placas 3M™ Petrifilm™

2.4.4. Determinación de *Escherichia coli* en Agar para Métodos Estándar

2.4.4.1. Preparación del Agar para Métodos Estándar

- 1) Calcular la cantidad de agar que se va a pesar en dependencia del volumen de medio a preparar (23.5g/ L)
- 2) Pesar el medio de cultivo y colocar en un erlenmeyer.
- 3) Agregar el volumen requerido de agua destilada y proceder a calentar.
- 4) Hacer hervir el medio por un minuto y retirarlo del fuego.
- 5) Esterilizarlo en autoclave por 30 minutos.
- 6) Dejar que su temperatura alcance 45°C aproximadamente.
- 7) Colocar en cajas Petri y esperar que se solidifique.

2.4.4.2. Siembra

- 1) Tomar un hisopo e introducirlo en los tubos que contienen la cuarta dilución de la muestra.
- 2) Agitar el hisopo y ejercer presión sobre las paredes del tubo para eliminar el exceso de inóculo.

- 3) Sembrar el inóculo en el agar por medio de movimiento circulares del hisopo.
- 4) Realizar un estriado en tres direcciones con ayuda de un asa estéril.
- 5) Incubar las cajas Petri a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
- 6) Observar las características de las cepas que han crecido.

2.4.5. Determinación de microorganismos Coliformes totales por la técnica del Número más probable (NMP).

2.4.5.1. Prueba presuntiva

Los tubos de vidrio a emplearse contienen el caldo verde bilis brillante y el tubo Durhan invertido, en su interior.

- 1) Tomar 1mL de la solución madre y colocar en un tubo de vidrio que contenga 9mL del caldo verde bilis brillante y mezclar, obteniendo la primera dilución.
- 2) Transferir 1 mL del tubo que contiene la primera dilución a otro tubo que contenga 9 mL del caldo y homogenizar, obteniendo la segunda dilución.
- 3) Coger 1 mL del segundo tubo e igualmente colocar en un tubo con 9mL del caldo, resultando así la tercera dilución.
- 4) Proceder a seguir los pasos anteriores para cada una de las muestras seleccionadas.
- 5) Incubar los tubos a 30°C por un período de 48 horas.
- 6) Los tubos que presenten crecimiento a través de la formación de gas en el interior de los tubos Durhan, considerarlos como presuntos positivos.
- 7) Someter a la prueba confirmatoria los tubos probablemente positivos.

Para hacer la prueba confirmatoria se requiere preparar el agar eosina azul de metileno por lo que se procede de la siguiente manera:

1. De acuerdo a las instrucciones establecidas en el envase del agar (36 g en 1L de agua), efectuar los cálculos correspondientes de acuerdo al volumen requerido.
2. Pesar los gramos del agar que sean necesarios.
3. Colocar el agar en un erlenmeyer, agregar un poco de agua destilada y disolverlo por agitación.
4. Incorporar el agua destilada restante para completar el volumen requerido y calentar el medio en un reverbero para una completa disolución.
5. Dejar que hierva por 1 minuto y retirarlo del fuego.
6. Esterilizar el medio en autoclave por 30 minutos. Luego esperar que su temperatura disminuya hasta 45°C aproximadamente.

7. Colocar el medio de cultivo en cajas Petri y dejar que éste se solidifique.

2.4.5.2. Prueba confirmatoria

- 1) Agitar los tubos formadores de gas, introducir un asa de inoculación y sembrar por estría en las cajas Petri que contienen eosina azul de metileno e identificarlas.
- 2) Invertir las placas e incubarlas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.
- 3) Si hay crecimiento de bacterias lactosa positivas de color oscuro con brillo verde metálico se confirma la presencia de *Escherichia coli*.
- 4) Anotar de cada muestra los tubos confirmados como positivos. (NTE INEN 1529-6, 1990)

2.4.5.3. Prueba confirmatoria del crecimiento de *E.coli* en las placas Petrifilm

- 1) Coger las placas Petrifilm para *E. coli* y con un asa estéril tomar una colonia azul con gas de la película superior que contiene gel.
- 2) Sembrar por estría en agar eosina azul de metileno.
- 3) Incubar las cajas Petri a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.
- 4) Observar el crecimiento bacteriano.

2.4.5.4. Lectura e interpretación

Confirmar la presencia de *Escherichia coli* en aquellas cajas Petri que se observen colonias oscuras con brillo verde metálico.

2.4.6. Confirmación de *Staphylococcus aureus* mediante fermentación del manitol.

2.4.6.1. Preparación del agar manitol salado

- 1) Efectuar los cálculos correspondientes a los gramos que se requiere pesar de acuerdo al volumen del medio a utilizar según las indicaciones contenidas en el envase del agar (111.02g/L de agua).
- 2) Pesar los gramos necesarios y colocarlos en un erlenmeyer.
- 3) Disolver el agar colocando una pequeña cantidad de agua destilada y agitándolo.
- 4) Agregar el volumen de agua destilada restante, calentarlo y dejarlo hervir por un minuto.
- 5) Esterilizar el medio en el autoclave por 30 minutos.

- 6) Dejar que su temperatura disminuya (45 °C aprox.) y colocar en cajas Petri un volumen de 15 a 20 mL en cada una.
- 7) Esperar que el medio se solidifique y está listo para su empleo.

2.4.6.2. *Siembra*

- 1) Tomar las placas Petrifilm Staph Express que contengan colonias moradas y con la ayuda de un asa de platino estéril, tomar una colonia de la película superior que contiene el gel.
- 2) Sembrar por estría el contenido del asa en la caja Petri e identificarla.
- 3) Invertir la placa e incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas
- 4) Observar el crecimiento bacteriano

2.4.6.3. *Lectura e interpretación*

Confirmar la presencia de *Staphylococcus aureus* en aquellas placas que presenten crecimiento de colonias amarillas y a su alrededor una zona del mismo color.

2.4.7. Aislamiento de colonias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* empleando Agar nutritivo

2.4.7.1. *Preparación del Agar nutritivo*

- 1) Realizar los cálculos correspondientes a la cantidad de agar a pesar de acuerdo al volumen requerido (23 g por litro de agua).
- 2) Pesar los gramos necesarios de agar nutritivo y colocar en un Erlenmeyer.
- 3) Agregar el necesario volumen de agua destilada y disolver el medio por acción del calor, dejando que hierva por un minuto para asegurar una completa disolución.
- 4) Autoclavar el medio por 30 min y dejarlo que alcance una temperatura de 45°C .
- 5) Colocar un volumen de 15 a 20 mL del medio en cada caja Petri y esperar su solidificación.

2.4.7.2. *Repique en agar nutritivo*

- 1) Escoger las cajas Petri de eosina azul de metileno en las que han crecido las colonias de *Escherichia coli*.

- 2) Dividir la placa Petri que contiene el agar nutritivo en secciones de acuerdo al número de placas en las que se evidenció crecimiento bacteriano.
- 3) Con una aguja de platino estéril tomar una colonia de *Escherichia coli* por cada placa escogida anteriormente.
- 4) Hacer repiques de cada colonia tomada en cada una de las diferentes secciones del agar nutritivo.
- 5) Invertir la caja e incubarla a 35°C por 24 horas.
- 6) Proceder de la misma manera que se indica en el paso 1, 2, 3, 4, 5 para el repique de *Staphylococcus aureus*, considerando que las placas escogidas serán las que muestren fermentación de manitol.

2.4.8. Tinción Gram

2.4.8.1. Preparación de la muestra

- 1) Tomar un portaobjetos, codificarlo y colocar una gota de solución salina estéril.
- 2) Coger con la aguja de inoculación una pequeña muestra de colonia de *Escherichia coli* de la caja con eosina azul de metileno o una colonia de *Staphylococcus aureus* de la caja con agar manitol y disolverla en la gota de solución salina.
- 3) Fijar la muestra flameándola tres veces en la llama del mechero.

2.4.8.2. Coloración Gram

- 1) Colocar cristal violeta sobre la muestra, dejar actuar un minuto y lavar con agua de la llave.
- 2) Adicionar lugol por un minuto y lavar con agua de la llave.
- 3) Añadir decolorante por 30 segundos y proceder a lavar la placa.
- 4) Finalmente teñir la placa con safranina, dejar actuar un minuto y lavarla.
- 5) Esperar que se seque y observar al microscopio. (Bailey y Scott, 2009; p.81)

2.4.9. Antibiograma mediante el Método de difusión en agar según Kirby Bauer

2.4.9.1. Preparación del medio de cultivo Mueller-Hinton

- 1) Efectuar los cálculos correspondientes a los gramos que se requiere pesar de acuerdo al volumen del medio a utilizar según las indicaciones contenidas en el envase del agar (38g/L de agua).
- 2) Transferir los gramos del agar a un erlenmeyer y agregar el volumen de agua destilada requerido.
- 3) Calentar el medio de cultivo permitiendo que hierva por un minuto para una completa disolución.
- 4) Esterilizarlo en autoclave durante 30 minutos y esperar que su temperatura alcance 45°C.
- 5) Distribuir un volumen de 15 a 20 mL por cada caja Petri y dejar que se solidifique.

2.4.9.2. Preparación del inóculo

- 1) Colocar 4mL de agua destilada estéril por cada tubo de ensayo a utilizarse.
- 2) Tomar de 3 a 5 colonias de una sección del agar nutritivo con ayuda de un asa bacteriológica estéril e inocular en un tubo de ensayo que contiene agua estéril.
- 3) Homogenizar el tubo y comparar su turbidez con la que presenta el estándar McFarland.

2.4.9.3. Inoculación en agar Mueller Hinton

- 1) Coger un hisopo estéril e introducirlo en el tubo de ensayo inoculado, humedecerlo y eliminar su excedente presionándolo en las paredes del tubo.
- 2) Realizar un estriado en agar Mueller Hinton en varias direcciones sin dejar espacios vacíos en la placa Petri para que la bacteria se disperse correctamente.
- 3) Dejar secar el inóculo. (Figura 4-2)

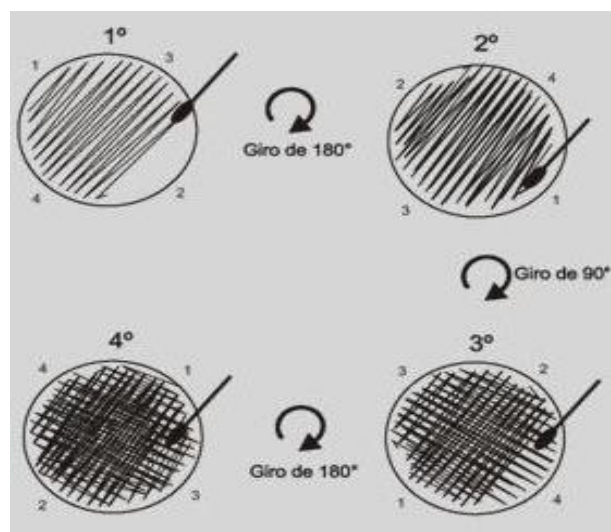


Figura 4-2. Siembra del inóculo para antibiograma
Fuente: Lomar y Diamant, 1996

2.4.10. Colocación de los discos de antibióticos

- 1) Tomar el disco con la pinza estéril y colocar en la periferia de la caja de agar Mueller Hinton, presionándolo suavemente para evitar que se caiga.
- 2) Coger un segundo disco y colocar a una buena distancia del primero.
- 3) Proceder de la misma manera con otros dos discos más, manteniendo distancia entre ellos para facilitar su posterior lectura.
- 4) Invertir la caja e incubarla a 35°C durante 16 a 24 horas
- 5) Proceder a medir los halos formados por cada uno de los discos colocados.
- 6) Interpretar los resultados obtenidos.

2.4.11. Procedimientos Estadísticos

Luego de obtener los resultados del análisis microbiológico en placas Petrifilm, se procedió a elaborar una base de datos con el recuento de UFC/mL por microorganismo estudiado, para lo cual se utilizó el programa Microsoft Excel 2013.

Posteriormente la base de datos fue procesada con el paquete estadístico SPSS v. 23.00, sometiéndola a la prueba de homogeneidad de varianzas a través del estadístico de Levene para conocer si existe o no homogeneidad entre los siete grupos independientes. Seguidamente se aplicó el test de ANOVA de un factor para comparar las medias de los grupos.

Los datos cuantitativos se resumieron mediante el cálculo de la medida de tendencia central “media” y la dispersión se presentó como la desviación estándar y la varianza.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Procedimiento Estadístico

3.1.1. Estadístico de Levene

$$H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2$$

$$H_1 : \sigma_i^2 \neq \sigma_j^2 \text{ para algún } i \neq j \quad i, j = 1, 2, \dots, t$$

Se acepta la hipótesis nula (H_0) cuando $p \geq 0.05$ y se la rechaza cuando $p \leq 0.05$.

Tabla 1-3: Nivel de significancia según estadístico de Levene.

Microorganismo Indicador	Nivel de significancia (p)
<i>Coliformes totales</i>	0,032
<i>Escherichia coli</i>	0,000
<i>Aerobios mesófilos</i>	0,049
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,009

Realizado por: Jennifer Lluquín

Al observar la tabla 1-3 se puede apreciar que todos los niveles de significancia son menores a 0.05 por lo que se rechaza H_0 y se acepta la hipótesis alternativa H_1 , es decir las varianzas de los grupos independientes no son homogéneas. Sin embargo cumplen con la distribución normal y son muestras independientes por lo que se procedió a emplear el test de ANOVA.

3.1.2. ANOVA de un factor

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$ Las medias poblacionales son iguales

H_1 : Al menos dos medias poblacionales son distintas

Se acepta la hipótesis nula (H_0) cuando $p \geq 0.05$ y se la rechaza cuando $p \leq 0.05$.

Tabla 2-3: Nivel de significancia del Test de ANOVA de un factor

Microorganismo Indicador	Nivel de significancia (p)
<i>Coliformes totales</i>	0,099
<i>Escherichia coli</i>	0,079
<i>Aerobios mesófilos</i>	0,064
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,156

Realizado por: Jennifer Lluquín

Como puede apreciarse en la tabla 2-3 los niveles de significancia obtenidos son mayores a 0,05 por lo tanto se acepta la hipótesis H_0 , es decir que las medias de los siete grupos independientes son iguales, lo cual indica que las muestras tomadas de los distintos puesto de venta ambulante mantienen similares niveles de contaminación bacteriana con respecto a cada microorganismos analizado.

3.2. Análisis microbiológico de la leche cruda

Los resultados que se exponen a continuación corresponden a siete muestras de leche cruda tomadas en los puestos de expendio del mercado “San Alfonso”.

Los muestreos se llevaron a cabo por tres semanas, recogiendo cada sábado las siete muestras para su posterior análisis.

3.2.1. Recuento de Coliformes Totales y *Escherichia coli* de la leche cruda.

Tabla 3-3: Recuento de microorganismos *Coliformes totales* en leche cruda.

Nº muestras	Nº réplicas	UFC/mL	Media	Desviación estándar	Varianza
M1	R1	410.000	226.667	168.028	2,823x10 ¹⁰
	R2	190.000			
	R3	800.00			
M2	R1	400.000	233.667	164.531	2,707x10 ¹⁰
	R2	230.000			
	R3	71.000			
M3	R1	7.000	4.667	2.517	6.333
	R2	2.000			
	R3	5.000			
M4	R1	175.000	68.333	93.586	8.758
	R2	30.000			
	R3	0			
M5	R1	87.000	73.333	13.051	170.333
	R2	72.000			
	R3	61.000			
M6	R1	210.000	79.333	114.023	1,3x10 ¹⁰
	R2	0			
	R3	28.000			
M7	R1	33.000	35.667	26.102	681.333
	R2	11.000			
	R3	63.000			

Realizado por: Jennifer Lluquín

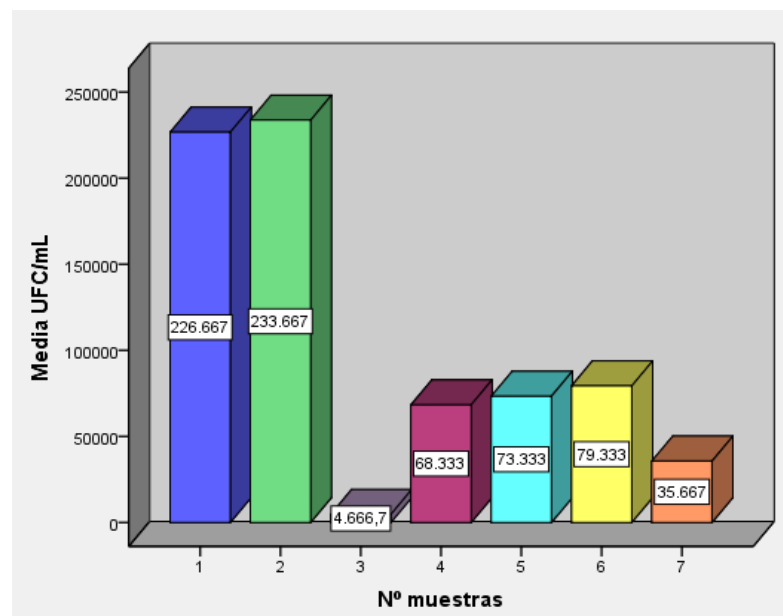


Gráfico 1-3: Recuento de *Coliformes totales* en leche cruda.

Tabla 4-3: Recuento de *Escherichia coli* en leche cruda.

Nº muestras	Nº réplicas	UFC/mL	Media UFC/mL	Desviación estándar	Varianza
M1	R1	1.000	2000	1.732	3.000
	R2	1.000			
	R3	4.000			
M2	R1	4.000	3333.3	577,35	333.333
	R2	3.000			
	R3	3.000			
M3	R1	1.000	1333.3	577,35	333.333
	R2	2.000			
	R3	1.000			
M4	R1	0	0	0	0
	R2	0			
	R3	0			
M5	R1	0	0	0	0
	R2	0			
	R3	0			
M6	R1	100	33.3	57,74	3.333
	R2	0			
	R3	0			
M7	R1	60.000	20.333	34.356	1.180
	R2	0			
	R3	1.000			

Realizado por: Jennifer Lluquín

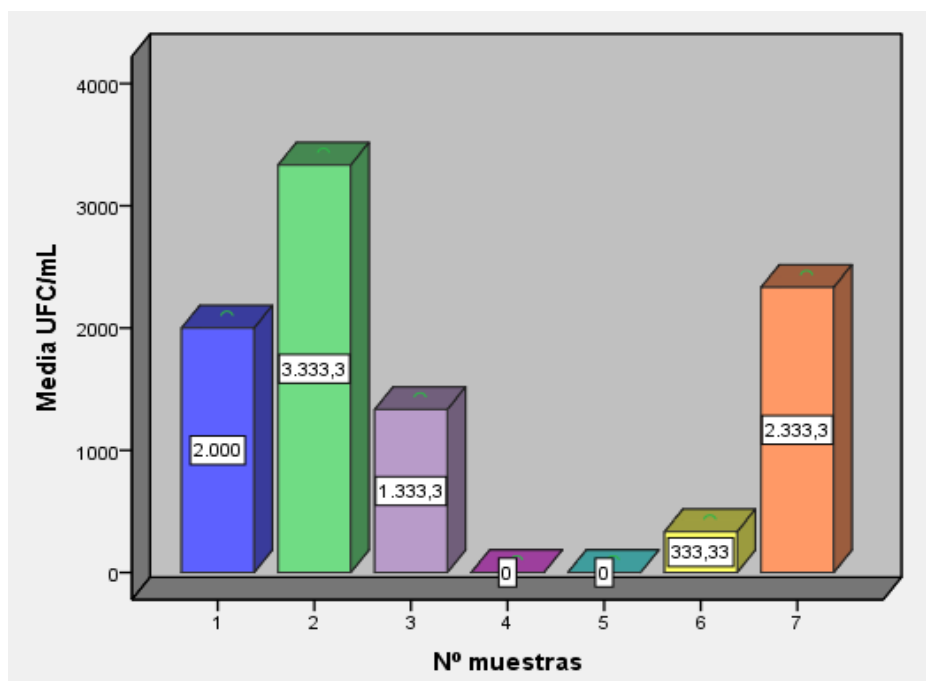


Gráfico 2-3: Recuento de *Escherichia coli* en leche cruda.

De acuerdo al Reglamento Técnico RTCR: 401-2006 se establece como límite máximo permitido de bacterias *Coliformes totales* 2.000 UFC/mL, dato sobrepasado por todas las muestras de

leche cruda analizadas y posible indicador de contaminación fecal, por lo tanto para evidenciar o descartar este tipo de contaminación se procedió a determinar conjuntamente la presencia de *Escherichia coli*, basándose en el mismo reglamento la cantidad estándar máxima permisible para esta bacteria es de 100 UFC/mL, lo cual al apreciar en la tabla 4-3 puede observarse que el 42.9% (3/7) de las muestras cumplen con el parámetro microbiológico y se las puede considerar aptas para el consumo de la población o para su empleo en la fabricación de derivados lácteos.

Moreno F, et al., 2007 demostró la relación que existe entre el secado de los pezones previo ordeño y la ausencia del secado con respecto a la cantidad de *Coliformes totales*, es así que reportó un recuento de 134.600 UFC/mL en los sistemas productivos carentes de secado y 78.026 UFC/mL en los sistemas productivos que practican el secado de pezones, por lo que manifestó que los pezones húmedos sometidos a ordeño aumentan el riesgo de infecciones intramamarias ya que el agua conduce los microorganismos hasta la punta del pezón contaminando la leche y elevando el riesgo de infección. También investigó la influencia del proceso de desinfección en el recuento de coliformes obteniendo como resultados 162.250 UFC/mL en situaciones que no se realiza la desinfección en los hatos y de 68.626 UFC/mL al ejecutarse la desinfección.

Molineri A, et al., 2009 destacan que el 70.5% de las muestras de leche estudiadas presentaron un recuento de coliformes totales menor a 100 UFC/mL, valor de excelencia para las leches de tanque de frío estudiadas. En lo referente al conteo de *Escherichia coli* se establece una semejanza con lo obtenido en el presente trabajo puesto que el 49.4% de las muestras no tuvieron presencia del coliforme fecal.

Mariscal P, et al., 2013, reportaron que el 100% (14/14) de las muestras de leche expendidas en los mercados de abasto de Trinidad Bolivia presentaron valores mayores al aceptado (200 UFC/mL) para organismos coliformes por lo que no se les considera leches de buena calidad.

En Cuba, Martínez A, et al., 2015 llevó a cabo el estudio microbiológico de la leche cruda de una cadena de producción, arrojando como resultados que el promedio de *Coliformes totales* fue de 1×10^5 UFC/mL en tanto que *Escherichia coli* fue positiva para el 98% de las muestras, alto recuento que indica las inadecuadas condiciones higiénicas que favorecen su crecimiento.

La presencia de *Escherichia coli* es un indicativo de contaminación fecal por el inadecuado e insuficiente manejo higiénico de la rutina de ordeño sobretodo de la limpieza de la piel de los pezones, manos del ordeñador y pezoneras así como la exposición de la leche a material fecal. (Moreno, et al., 2007, <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/1802>)

3.2.2. Determinación de *Escherichia coli* en Agar para Métodos Estándar

Cuadro 1-3. Crecimiento de bacterias en Agar para Métodos Estándar

Nº muestra	Características de las cepas		
	Colonias cremas y medianas		
	Primer muestreo	Segundo muestreo	Tercer muestreo
M1	+	+	+
M2	+	+	+
M3	+	+	+

Realizado por: Jennifer Lluquín

Fuente: <http://www.dibico.com/fichast/1020.pdf>

Las muestras elegidas para sembrar en agar para métodos estándar fueron las mismas que se sometieron a la prueba del número más probable, con la finalidad de identificar la presencia de *Escherichia coli*. Las colonias que se desarrollaron en los tres muestreos fueron de color crema y de un tamaño mediano, características que pueden presentar tanto *Escherichia coli* como *Staphylococcus aureus*, considerando que este medio de cultivo se emplea para el crecimiento de bacterias con interés sanitario en el ámbito alimenticio, por lo que no se considera un medio específico para crecimiento de la bacteria en estudio y se evidenció la presencia del microorganismos de interés por medio de la prueba confirmatoria del NMP.

3.2.3. Determinación del número más probable (NMP) para microorganismos coliformes.

Tabla 5-3: Prueba del Número más probable de coliformes/mL de muestra

Nº muestra	Número de tubos positivos en cada dilución			NMP por mL
	Dilución (10 ⁻¹)	Dilución (10 ⁻²)	(10 ⁻³)	
Muestra 1	3	3	1	460
Muestra 3	3	2	2	210
Muestra 6	3	3	2	1100

Realizado por: Jennifer Lluquín

Fuente: NTE INEN 1529-6

La norma ecuatoriana NTE INEN 9 no incluye el recuento de *Coliformes totales* en leche cruda como parámetro de determinación de la calidad microbiológica del alimento, por lo que tomando como referencia la norma mexicana NOM-243-SSA1-2010 en la que se establece que la leche cruda en los puntos de venta debe contener menos de 20 UFC/mL se puede expresar que las muestras del producto analizado sobrepasan dicho estándar lo cual coincide con los resultados obtenidos al sembrar en placas Petrifilm para determinación de coliformes.

El número de *Coliformes totales* encontrados en las muestras analizadas se halla en un rango de 210 a 1100 NMP/mL, lo cual mantiene relación con el estudio llevado a cabo por Rodríguez V, et al., 2014 al demostrar que el 85,91% de sus muestras de leche cruda analizadas presentaron valores desde 101 y mayores a 750 NMP/mL.

En el análisis microbiológico de leche de origen orgánico Fuentes G, et al., 2013 expusieron que todas las muestras de leche presentaron menos de 3NMP/mL con excepción en una muestra donde se obtuvo 23 NMP/mL y en la leche de tanque de almacenamiento donde el conteo fue de 15×10^7 NMP/mL, atribuyendo los altos recuento de este agente microbiano a problemas de contaminación durante el proceso de producción de leche de vaca.

En Colombia se realizó un estudio para conocer la calidad microbiológica de la leche cruda proveniente de diferentes regiones del país, el resultado promedio de *Coliformes totales* fue de 4.589 UFC/mL, valor mayor al establecido en la legislación americana la cual reconoce como norma 750 UFC/mL y establece que la leche considerada como ideal debe contener menos de 50 UFC/mL. (Calderón, et al., 2006)

En el trabajo llevado a cabo por Dávila, et al, 2006 se analizó la calidad microbiológica de la materia prima para la elaboración de queso, pudiendo manifestar que el recuento de *Coliformes totales* en leche cruda fue elevado oscilando entre 4.6×10^4 NMP/mL y $2,4 \times 10^5$ NMP/mL, indicativo de posibles malas prácticas de manipulación en el ordeño del ganado vacuno en fincas proveedoras de leche a la planta o una inadecuada refrigeración inmediatamente después que se ha obtenido la misma.

La presencia de un alto número de bacterias *Coliformes totales* en leche cruda representa un evaluador del grado de limpieza de las manos de los operarios, de la limpieza o desinfección de los pezones del animal o pezoneras, entre otras. Por lo tanto a través del presente estudio se refleja la ausencia de la práctica de actividades higiénicas y sanitarias imprescindibles a aplicarse durante el proceso de su obtención.

3.2.4. Crecimiento de *E. coli* en agar eosina azul de metileno.

Para conocer si los microorganismos que fermentaron la lactosa al producir gas en el interior de los tubos Durham se trataban de *Escherichia coli* se aplicó la prueba confirmatoria sembrando los inóculos de los tubos positivos en agar eosina azul de metileno e igualmente para confirmar que las colonias azules con gas que crecieron en las placas Petrifilm se trataban de *E.coli*.

Cuadro 2-3. Confirmación de *Escherichia coli***Presencia de colonias oscuras con brillo verde metálico**

Nº muestra	Primer muestreo	Segundo muestreo	Tercer muestreo
M1	+	+	+
M2	-	+	+
M3	+	+	+
M4	-	-	-
M5	-	-	-
M6	+	-	-
M7	+	-	+

Realizado por: Jennifer Lluquín

3.2.5. Aerobios mesófilos**Tabla 6-3:** Recuento de *Aerobios mesófilos* en leche cruda

Nº muestras	Nº réplicas	UFC/mL	Media	Desviación estándar	Varianza
M1	R1	490.000	543.33	244.404	5.973x10 ¹⁰
	R2	330.000			
	R3	810.000			
M2	R1	2.800.000	1.733.333	1.050	1.103x10 ¹²
	R2	1.700.000			
	R3	700.000			
M3	R1	800.000	796.667	245.017	6x10 ¹⁰
	R2	550.000			
	R3	1.040.000			
M4	R1	150.000	256.667	211.266	4.463x10 ¹⁰
	R2	500.000			
	R3	120.000			
M5	R1	680.000	400.000	280.000	7.84x10 ¹⁰
	R2	120.000			
	R3	400.000			
M6	R1	350.000	1.100.000	936.750	8.775x10 ¹¹
	R2	800.000			
	R3	2.150.000			
M7	R1	150.000	443.333	290.057	8.413x10 ¹⁰
	R2	730.000			
	R3	450.000			

Realizado por: Jennifer Lluquín

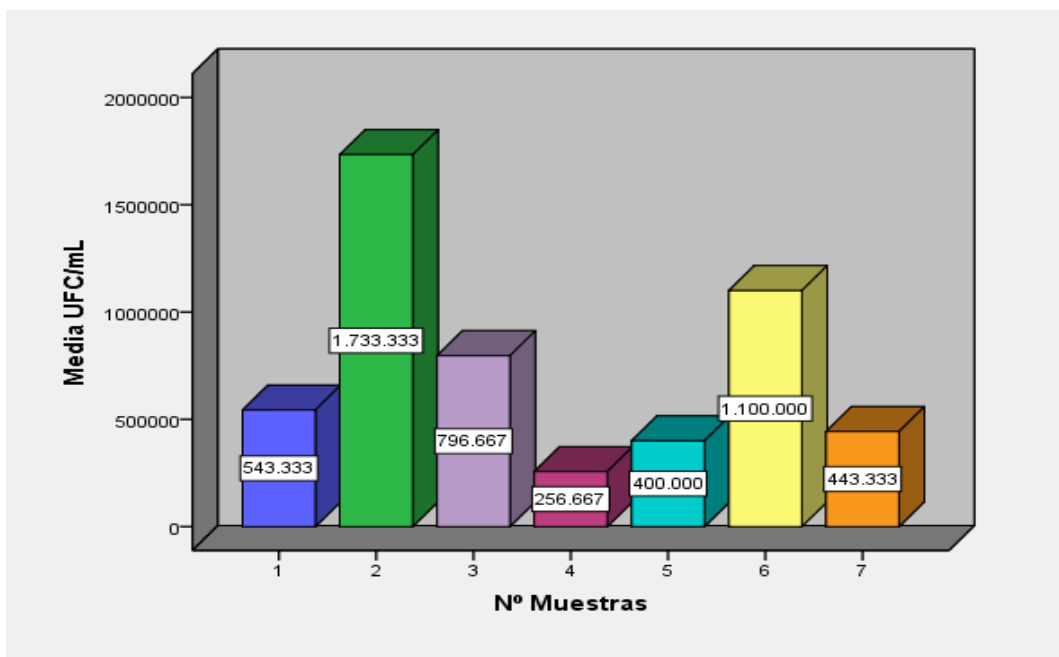


Gráfico 3-3: Recuento de *Aerobios mesófilos* en leche cruda.

La norma NTE INEN 9 para leche cruda establece como límite máximo permitido para *Aerobios mesófilos* 1.5×10^6 UFC/mL, valor superado por la segunda muestra analizada y expuesto en la tabla 9-3 lo que representa que el 14,29% (1/7) de las muestras no es apto para el consumo humano. Además de acuerdo a la clasificación dada por las norma COVENIN 903-93 la M4 se considera de primera clase (<150000 UFC/mL); M1, M2,M3, M5, M6 y M7 pertenece a la tercera clase (<300000 UFC/mL)

Álvarez G, et al., 2012 en la evaluación de la calidad de la leche cruda de acuerdo a las épocas del año, se reportó que las bacterias aerobias mesofílicas sí presentaron efecto por la época de muestreo, apreciándose que la mayor cantidad de bacterias se presentan en la época seca (13.152 UFC/mL) y disminuye en épocas de lluvias (7.220 UFC/mL) y en invierno (8.187 UFC/mL), sin embargo todas las muestras analizadas se encuentran dentro de lo que se señala en la norma de referencia (100. 000 UFC/mL máximo). Considerando el estándar de 10.000 UFC/mL para leche de buena calidad se mencionó que sólo en la época seca la leche no tiene buena calidad higiénica.

En la ciudad de Cuenca, Rojas J, 2013, realizó un estudio similar al propuesto, en el cual se demostró que el 56.09% de muestras de leche cruda expandida era apta para consumirla o emplearla en la elaboración de otros productos lácteos.

Luigi, T, et al., 2013, reportaron un alto recuento de *Aerobios mesófilos* mencionando que el 75,2% de las muestras analizadas superan el valor establecido en la norma oficial venezolana, reflejando condiciones higiénico-sanitarias deficientes.

Otro estudio efectuado por Buñay y Peralta, 2015 en la ciudad de Cuenca arrojó como resultado que el promedio de *Aerobios mesófilos* superaron el estándar de la norma ecuatoriana vigente al ser de 6.8×10^6 UFC/mL.

Rodríguez V, et al., 2015 reportó en su estudio que el promedio de mesófilos fue de 1.039.216 UFC/mL con un valor mínimo de 1000 y máximo de 9.400.000 UFC/mL, manifestándose que el alto recuento de mesófilos puede deberse a que sólo el 2, 01% de las empresas analizadas cuentan con tanque de refrigeración para la conservación de la leche o por la influencia de malas condiciones higiénicas de establos, ausencia de la implementación de prácticas de higienización de pezones, incorrecta rutina de limpieza, falta de desinfección de recipientes empleados.

De acuerdo a los resultados plasmados en la presente investigación se observa un alto recuento de *Aerobios mesófilos* siendo incluso una de las muestras superior a la norma ecuatoriana vigente y en comparación con normas internacionales las muestras de leche cruda en estudio están fuera de lo señalado puesto que la norma COVENIN indica que una leche de calidad premium debe contener menos de 1×10^5 UFC/mL e igualmente en el documento “Recopilación de normas microbiológicas de alimentos y asimilados y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario” se indica que el valor máximo permisible es de 3×10^5 UFC/mL, en base a estos valores la calidad bacteriológica de la leche es deficiente.

3.2.6. *Staphylococcus aureus*

Tabla 7-3: Recuento de *Staphylococcus aureus* en leche cruda

N° muestras	N° réplicas	UFC/mL	Media	Desviación estándar	Varianza
M1	R1	0	70.000	65.574	4.300.000
	R2	8.0000			
	R3	130.000			
M2	R1	0	60.000	72.111	5.200.000
	R2	40.000			
	R3	140.000			
M3	R1	0	50.000	55.677	3.100.000
	R2	40.000			
	R3	110.000			
M4	R1	1.600.000	600.000	871.780	7.6x10 ¹¹
	R2	200.000			
	R3	0			
M5	R1	10.000	30.000	20.000	400.000
	R2	30.000			
	R3	50.000			
M6	R1	1.240.000	1.326.667	1.372.054	1.883x10 ¹²
	R2	0			
	R3	2.740.000			
M7	R1	0	93.333.33	136.504	1.863x10 ¹⁰
	R2	30.000			
	R3	250.000			

Realizado por: Jennifer Lluquín

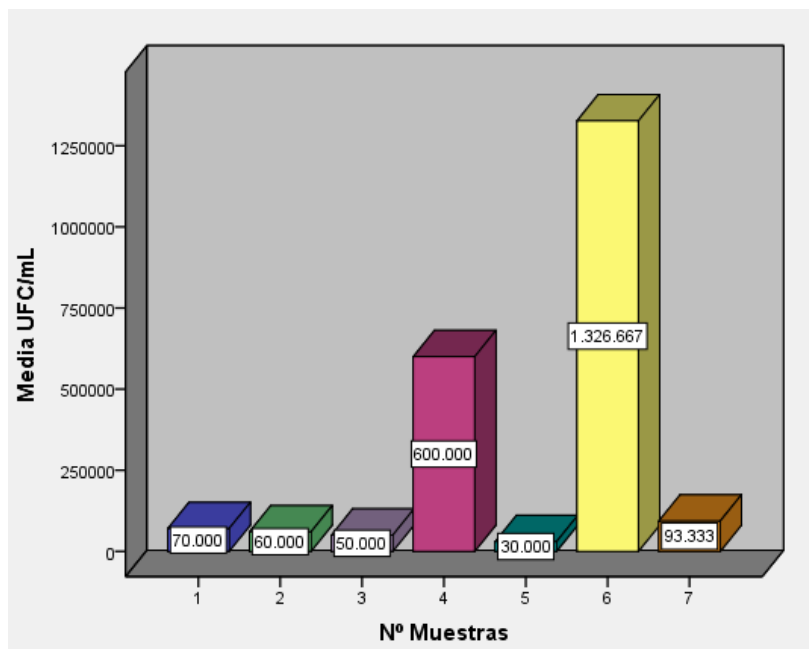


Gráfico 4-3: Recuento de *Staphylococcus aureus* en UFC/mL

En el Reglamento Técnico 401-2006 se establece que el recuento máximo permitido de *Staphylococcus aureus* en leche cruda es de 500 UFC/mL, valor que no coincide con los obtenidos en la tabla 10-3, existiendo un recuento bacteriano entre 3.000 UFC/mL hasta 1.326.667 UFC/mL, por lo tanto las muestras analizadas no cumple con el parámetro microbiológico indicado para considerarlas aptas para consumo humano.

Martínez M, et al., 2013, analizaron 149 muestras de leche en dos épocas del año verano e inviernos cuyos promedios de *Staphylococcus aureus* fueron altos de 2.8×10^6 y 5.4×10^5 UFC/mL respectivamente. El mayor recuento de los agentes microbianos se obtuvo en verano constituyendo un riesgo de intoxicación alimentaria debido a que se admite que se requiere de 105/g de alimento para la formación de toxina suficiente para producir intoxicación. Además los elevados recuentos indican una posible infección intramamaria.

En otro estudio se evidencia igualmente un elevado conteo microbiano el cual se efectuó por Moreno, F., et al., 2003, quienes al evaluar la presencia de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche cruda obtuvieron en el primer muestreo un promedio de 62206 UFC/mL y en el segundo muestreo un promedio de 5575 UFC/mL. Además se evaluó la influencia del secado de los pezones de las vacas antes de ordeñarlas cuyos resultados fueron altos en los casos en los que las ubres se encontraban húmedas pues se reportaron 87600 UFC/mL y disminución de la cantidad de microorganismos al secar los pezones consiguiendo un recuento de 21481 UFC/mL, por lo tanto esta acción demuestra ser efectiva para controlar los conteos de la bacteria y así disminuir las infecciones intramamarias producidas por este agente.

Farías, et al, 2005, realizaron la identificación de agentes bacterianos patógenos en leche de 40 bovinos ordeñados de manera manual y de forma mecánica, reportando la existencia de *Staphylococcus aureus* en las leches obtenidos de forma mecánica, justificando lo obtenido al considerar que el ordeño con maquinaria ofrece múltiples oportunidades para la transmisión de las bacterias entre vacas y cuartos debido a la variaciones en la presión de vacío, desgaste de pezoneras, el sobre-ordeño, la falta de preparación de la ubre antes del ordeño y la presencia de animales con infección crónica.

En Argentina se evaluó la calidad higiénica de la leche cruda mediante marcadores microbiológicos dentro de los cuales se determinó *Staphylococcus aureus* siendo su recuento más alto en aquellas muestras recolectadas directamente de la ubre de la vaca en relación a la leche tomada del tanque de enfriamiento, resultados que confirmarían que esta región anatómica es una fuente natural de estos microorganismos y al mismo tiempo es el único sitio de contacto

indirecto entre la leche y las manos de los operarios, las cuales podrían constituir una fuente potencial. (Signorini, et al., 2008)

El alto recuento de *Staphylococcus aureus* puede deberse a posibles lesiones o heridas de las vacas que infectan la glándula mamaria y se transmite a los cuartos con animales sanos por medio de pezoneras, uso común de paños para limpiar las ubres o las manos del ordeñador.

3.2.7. Confirmación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche cruda

Cuadro 3-3. Muestras de leche cruda en las que fermentó el agar manitol salado.
Cambio de color del medio de rojo a amarillo

Nº muestra	Primer muestreo	Segundo muestreo	Tercer muestreo
M1	+	+	+
M2	+	+	+
M3	-	-	-
M4	+	-	-
M5	+	+	+
M6	+	-	+
M7	-	+	+

3.2.8. Tinción Gram

Se observó en el microscopio aquellas muestras que al crecer en agar eosina azul de metileno mostraron un color oscuro con brillo verde metálico (M1, M2, M3, M6 y M7), las cuales presentaron forma de bastón, morfología que coinciden con la descripción establecida por Rodríguez, G., 2002, en base a ello se puede decir que las bacterias observadas fueron bacilos; el color que mostraron fue violeta reaccionando negativamente a la coloración gram por lo tanto se trata de microorganismos gram negativos. Las características mencionadas son las que permiten identificar que las bacterias observadas fueron *Escherichia coli*. (Rodríguez, 2002: pp. 464-475; Hernández, 2002: p. 64)

Las muestras en las que se presencié la fermentación de manitol (M1, M2, M4, M5, M6 y M7) fueron las que se observaron en el microscopio, pudiendo encontrar bacterias de forma circular agrupadas en pares, formando cadenas cortas o a manera de racimo y desagrupadas, con una coloración rosada, indicativo de reacción positiva frente a la tinción Gram. Ésta información concuerda con lo expresado por Cervantes, E., et al., 2014 al mencionar que la forma y color

antes descrito son característica de *Staphylococcus aureus*, bacteria considerada como coco gram positivo. (Cervantes; Hernández, 2002: p. 64)

3.2.9. Antibiograma de *Escherichia coli*

Tabla 8-3: Porcentaje de resistencia y sensibilidad de *Escherichia coli* frente a 6 antibióticos.

N° muestra	Discos de antibióticos					
	Ampicilina 10 mcg	Estreptomina 10 mcg	Gentamicina 10 mcg	Kanamicina 30 mcg	Nitrofurantoina 300 mcg	Tetraciclina 30 mcg
M1	S	S	S	S	S	S
M2	R	S	S	R	S	S
M3	S	S	S	S	S	S
M6	S	R	S	S	S	R
M7	R	S	S	S	S	S
% de sensibilidad por antibiótico	60%	80%	100%	80%	100%	80%
% de resistencia por antibiótico	40%	20%	0%	20%	0%	20%

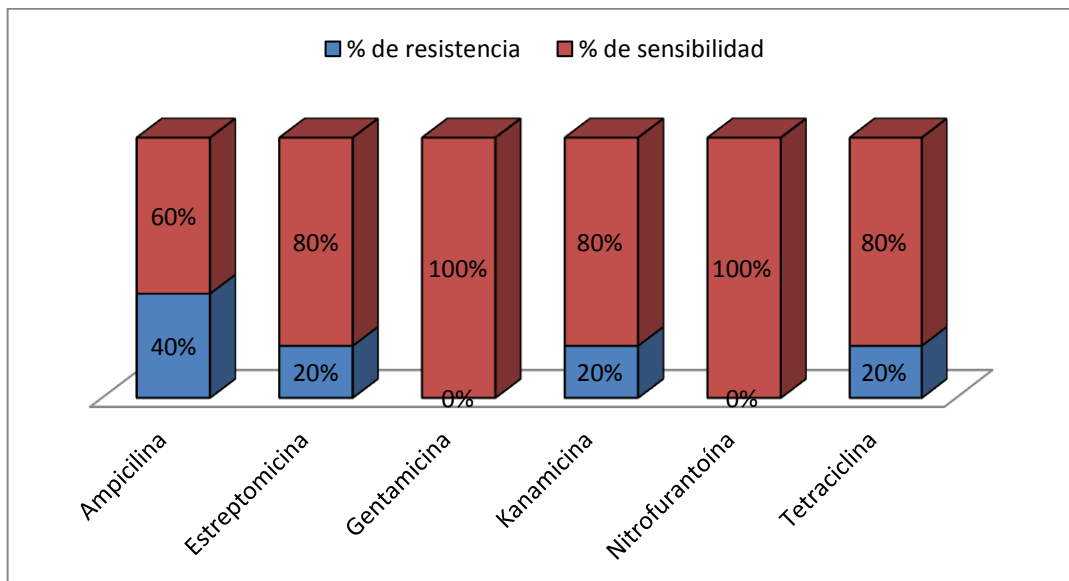


Gráfico 5-3. Porcentaje de resistencia y sensibilidad de *Escherichia coli* frente a 6 antibióticos

En la tabla 11-3 se aprecia que los antibióticos a los cuales las cepas de *E. coli* presentaron resistencia fueron ampicilina 40% (2/5), kanamicina 20% (1/5), estreptomina 20% (1/5) y tetraciclina 20% (1/5), mientras que la susceptibilidad la demostraron ante gentamicina y nitrofurantoina. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede mencionar que el antibiótico mayormente empleado inadecuadamente por parte de los ganaderos es la ampicilina,

antimicrobiano perteneciente al grupo de los betalactámicos e indicado para tratar la infección de la glándula mamaria. Congalo L, 2013 efectuó un estudio nacional en el que se revela la existencia del 48,5% de mastitis bovina en ganado.

Faría. J, et al., 1998 detectaron la presencia de antibióticos en 48 de 416 muestras de leche, aislándose de éstas 75 Enterobacterias siendo 17 de ellas *Escherichia coli*, bacteria que mostró resistencia a tetraciclina (40%), ampicilina (20%), nitrofurantoína (6,6%) y sensibilidad frente a gentamicina y estreptomina.

En otro trabajo realizado por Aponte. F., et al., 2007, para evaluar la sensibilidad a antibióticos se emplearon 371 muestras de leche cruda de las cuales se aisló *E. coli* en un 3.8%. Los porcentajes de resistencia de *Escherichia coli* a los antibacterianos fue mayor al actual estudio, es así que se demostró 100% de resistencia ante estreptomina, 86% para ampicilina, 57% a kanamicina, 50% frente a tetraciclina y una elevada sensibilidad a gentamicina, nitrofurantoína y penicilina siendo del 93%. El autor manifiesta que la resistencia y multiresistencia en este trabajo fue elevada lo que refleja el uso indiscriminado de antimicrobianos por el escaso o nulo control en lo referente a esta problemática.

En el artículo publicado por Martínez D, et al., 2013 se hace referencia a que *E. coli* aislado de vacas con mastitis mostró elevadas resistencias a tetraciclina (92%), estreptomina (90%), y amikacina (86%) y se evidenció resistencia a múltiples fármacos.

3.2.10. Antibiograma de *Staphylococcus aureus*

Tabla 9-3: Porcentaje de resistencia y sensibilidad de *Staphylococcus aureus* frente a 7 antibióticos.

Nº muestra	Discos de antibióticos						
	Amikacina 30 mcg	Cefoxitin	Ciprofloxacino 5 mcg	Eritromicina 15 mcg	Clindamicina 2mcg	Penicilina 10 U	Tetraciclina 30 mcg
M1	S	S	S	S	S	R	S
M2	S	S	S	S	S	S	S
M4	S	S	S	S	S	R	S
M5	S	S	S	S	S	S	S
M6	S	S	S	S	S	R	S
M7	S	S	S	S	S	R	S
% de sensibilidad por antibiótico	100%	100%	100%	100%	100%	33%	100%
% de resistencia por antibiótico	0%	0%	0%	0%	0%	67%	0%

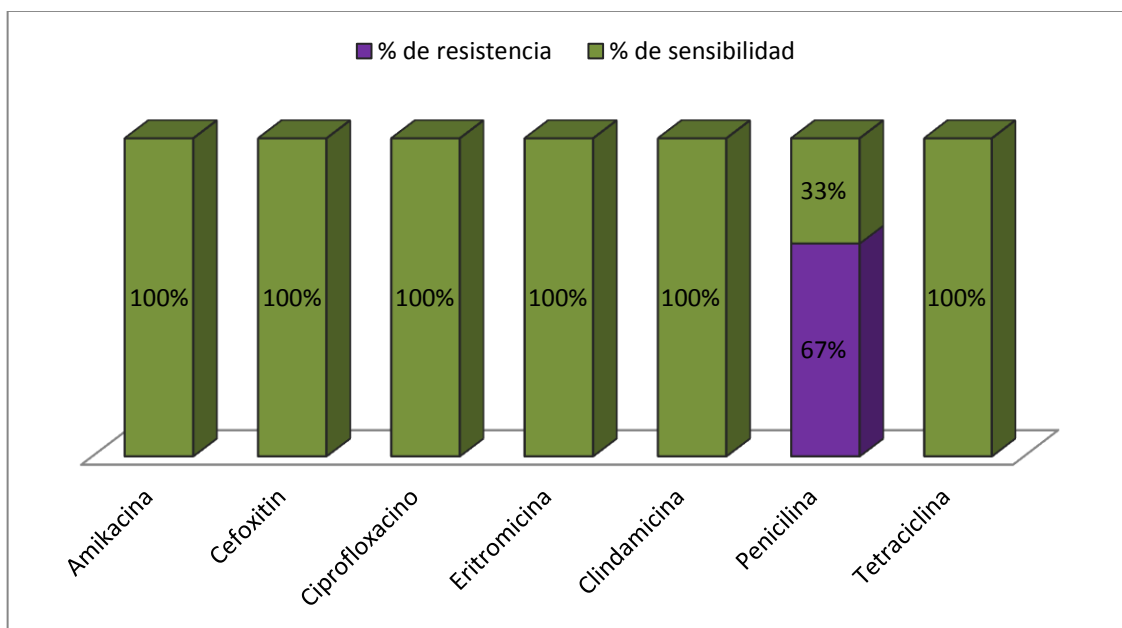


Gráfico 6-3. Porcentaje de resistencia y sensibilidad de *Staphylococcus aureus* frente a 7 antibióticos.

En la tabla 12-3 se observa que de las seis muestras de leche cruda analizadas el 67% (4/6) de ellas demostraron ser resistentes únicamente a penicilina, resultado respaldado por el estudio efectuado por Faría J, et al., 1999 en el estado de Zulia-Venezuela al evidenciar que de 45 cepas aisladas 15 pertenecientes a *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a penicilina y en el año de 2005 en otro estudio realizado por el mismo autor el cual trataba acerca de la sensibilidad a antimicrobianos de agentes patógenos mastitogénicos, se reportó que uno de los antibióticos al que *Staphylococcus aureus* demostró la mayor resistencia (13,63%) fue a penicilina, pero también existió resistencia frente a tetraciclina y eritromicina.

Arreces G., 2015 demostró en sus análisis que un bajo porcentaje de muestras de leche cruda de vaca equivalente al 6,67% (4/60) con presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a penicilina G.

A los trabajos anteriores, se adiciona la investigación hecha por Martínez, D., et al., 2015 basada en identificar las bacterias causantes de mastitis y la presencia de resistencia a algunos antibacterianos. Uno de los microorganismos que producen la infección fue *Staphylococcus aureus* el cual igualmente que en las otras investigaciones mostró resistencia a penicilina G.

En un estudio realizado a nivel nacional por Cholca S, et al., 2012, sobre los antibióticos empleados en ganado productor de leche se expone que una de las familias de antibióticos empleados con mayor frecuencia corresponde a los betalactámicos (39%) grupo dentro del cual

se encuentra la penicilina, manifestándose además que ya existe evidencia de resistencia a este grupo de medicamentos.

Puede observarse también que frente a amikacina, cefoxitin, ciprofloxacino, eritromicina, clindamicina y tetraciclina las bacterias fueron sensibles, datos coincidentes con el análisis efectuado por Valero, et al., 2010 al mostrar la prevalencia de sensibilidad del 100% ante cefoxitin, 95,1% a ciprofloxacino, 96,3% a eritromicina, 97.5% a clindamicina y 98,8% a tetraciclina. Respecto a amikacina se demostró sensibilidad del 93,33% en el trabajo publicado por Faría, J., et al., 1999, manteniendo relación con la investigación presente.

Considerando los resultados obtenidos en la presente investigación se puede mencionar que el grupo de antibióticos más utilizado en ganado lechero pertenece a los betalactámicos, al generar las cepas en estudio mayor resistencia frente ampicilina y penicilina. Estos medicamentos han sido empleados de manera inadecuada en el tratamiento o prevención de infecciones, lo que ha conducido al apareamiento de cepas resistentes, un problema de salud pública consecuencia de múltiples razones entre las que se menciona: el uso irracional del medicamento en forma empírica por personal no calificado, la libre venta del antimicrobiano pues según lo emitido en la resolución N° 047 por AGROCALIDAD son antibiótico que no requieren de forma obligatoria receta médica para su comercialización, o puede originarse por el incumplimiento del tiempo y dosificación necesaria para la eficacia en el tratamiento.

Esta resistencia trae como consecuencias dos aspectos importantes: disminución o pérdida total de eficacia en el tratamiento de infecciones en las vacas lecheras o la transmisión de bacterias fármaco-resistentes a los consumidores de leche cruda o productos elaborados a partir de este alimento, situación que pone en riesgo la salud humana ya que en el momento en que un paciente contraiga infecciones provocadas por bacterias fármaco-resistentes puede presente un pronóstico peor y mayor riesgo de mortalidad que aquellos individuos infectados con bacterias de la misma especie que no presenten esa resistencia, situación que implica también la necesidad de más recursos médicos. (Aponte, 2007; OMS, 2015)

CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de cuatro microorganismos indicadores de la calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda los mismos que fueron *Coliformes totales*, *Escherichia coli*, *Aerobios mesófilos* y *Staphylococcus aureus* presentando conteos microbiológicos altos.
- El recuento de microorganismos coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* sobrepasaron los límites máximos permitidos en el Reglamento Técnico RTCR; 401-2006. El conteo de aerobios mesófilos fue elevado a pesar de que la mayoría de las muestras de leche cruda se encontraron dentro del estándar establecido por la Norma NTE INEN 9. Estos resultados reflejan la deficiente calidad higiénico-sanitaria de la leche cruda a causa de la escasa o nula aplicación de Buenas Prácticas Lecheras en toda su cadena agroalimentaria.
- Las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* presentaron resistencia a penicilina y sensibilidad frente a ciprofloxacino, clindamicina, amikacina, tetraciclina y eritromicina.
- Las cepas aisladas de *Escherichia coli* mostraron la mayor resistencia frente a ampicilina y en menor porcentaje ante kanamicina, estreptomina y tetraciclina, resultando sensibles frente a gentamicina, nitrofurantoína, y neomicina. Los antibióticos usados frecuentemente de manera inadecuada por parte de los ganaderos para prevenir o tratar infecciones que afectan al ganado productor de leche, pertenecen al grupo de los betalactámicos.

RECOMENDACIONES

- Realizar un análisis microbiológico de la leche cruda en la etapa de su producción, almacenamiento, transporte y punto de venta, así como de la higiene del personal implicado en toda la cadena agroalimentaria para poder determinar puntos críticos de contaminación.
- Encaminar al personal encargado de la producción de leche cruda en Buenas Prácticas de Higiene en la rutina de ordeño para disminuir las cargas microbiológicas, cumplir con las normas establecidas y asegurar la salud del consumidor.
- Instruir a los vendedores ambulantes del mercado “San Alfonso” en el correcto manejo, almacenamiento, transporte y comercialización de la leche cruda para ofrecer un producto de calidad.
- Orientar al ganadero en el uso racional de antimicrobianos a través de la ejecución de normas nacionales que expongan los límites máximos permisibles del uso de los antibióticos y su correcta administración.
- Implementación de puestos de venta de leche cruda que cuenten con refrigeradoras para el mantenimiento de la cadena de frío. Acción llevada a cabo por las autoridades del Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal Riobamba.

BIBLIOGRAFÍA

ACUMEDIA. STANDARD METHODS AGAR [en línea]. [Consulta: 09 enero 2016]. Disponible en: http://www.neogen.com/Acumedial/pdf/ProdInfo/7157_PI.pdf

Agrocalidad. Resolución N°047 [en línea]. [Consulta: 23 enero 2016]. Disponible en: http://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad/images/pdfs/InocuidadAlimentaria/RESOLUCION_047_AVICOLAS.pdf

Agroindustria. *Fuentes de contaminación de la leche cruda* [en línea]. [Consulta: 13 octubre 2015]. Disponible en: <https://agroindustriacurc.files.wordpress.com/2011/09/fuentes-de-contaminacion-de-la-leche-cruda.pdf>

AGUHOB S & AXTELL B. *Procesamiento de lácteos*. Lima: ITDG-Perú; 1998.

ALAIS, Charles. *Ciencia de la leche*. 12va ed. México: Continental, 1998, p. 25

ÁLVAREZ, G; et al. Calidad de la leche cruda en unidades de producción familiar del sur de Ciudad de México. *Archivos de Medicina Veterinaria* [en línea], 2012, (México) 4 (3). [Consulta: 20 enero 2015]. ISSN 0301-732X. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2012000300005

ÁLVAREZ, Victoria; et al. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica*. España-Madrid: 1995, pp. 235-238

Analiza calidad [en línea]. [Consulta: 14 octubre 2015]. Disponible en: <http://www.analizacalidad.com/docftp/fi168arf2005-1.pdf>

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos y Tecnología Médica. *Guía de interpretación de resultados microbiológicos de alimentos*. [en línea]. [Consulta: 14 octubre 2015]. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/Guia_de_interpretacion_resultados_microbiologicos.pdf

APONTE, F. Perfil de resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción. *Mem.*

Inst. Investig. Cienc.Salud [en línea], 2007 (Paraguay) 5 (1), pp. 19-25. [Consulta: 23 enero 2015]. Disponible en: <http://revistascientificas.una.py/index.php/RIIC/article/viewFile/329/256>

ARRECES MARTÍNEZ, Guadalupe del Carmen. Determinación de la multiresistencia a los antibióticos en cepa de *Staphylococcus aureus*, aislada de leche cruda de vaca obtenida de una lechería del Departamento de Santa Ana (tesis). (Licenciatura) Universidad del Salvador, San Salvador, 2015. pp. 94-96. [Consulta: 23 enero 2016]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/8772/1/16103639.pdf>

BAILEY & SCOTT. *Diagnóstico Microbiológico*. 12^a ed. Argentina-Buenos Aires: Médica Panamericana, 2009, pp. 80-81

BARTON CB. *Consumo de leche cruda: no vale la pena el riesgo*. [en línea]. [Consulta: 12 octubre 2015]. Disponible en: http://www.alimentosecuador.com/descargas/bt4d8261cbafc00_leche.pdf

BD. *Manitols Salt Agar* [en línea]. [Consulta: 10 enero 2016]. Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>

BOGIO, Juan. *Presencia de antimicrobianos en leche*. [en línea]. Argentina-Córdoba: 2010. [Consulta: 06 enero 2016]. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/leche_subproductos/18-Antimicrobianos.pdf

BUÑAY, Narda & PERALTA, Fernanda. Determinación del recuento de aerobios mesófilos en leche cruda que ingresa a Industrias Lacto Ochoa-Fernández CIA.LTDA [en línea] (tesis). Universidad de Cuenca, Ecuador. 2015. p.57

CALDERÓN A; et al. “Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia”. *Rev.MVZ Córdoba*. [en línea]. 2006, (Colombia), 11 (1), pp. 725-737. [Consulta: 13 octubre 2015]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v11n1/v11n1a06>

CAMACHO A; et al. *Determinación de coliformes totales por cuenta en placa*. [en línea]. México: UNAM, 2009. [Consulta: 18 agosto 2015]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Tecnic-Basicas-Coliformes-en-placa_6528.pdf

CARAVANA, F; et al. *Bases de la Producción Animal*. Sevilla-España: 2003, p. 120

CASTILLO, Esequiel & DE LA CRUZ, T. Medicina Veterinaria Zootecnista [en línea]. 2012. [Consulta: 10 enero 2016]. Disponible en <http://es.slideshare.net/anthracis/cefalosporinas-farma2>

CASTILLO SHELLY, R & MESTRES LAGARRIGA, J. *Productos Lácteos Tecnología*. Barcelona-España: UNICS, 2004, p. 20-31

CDPH: California Department of Public Health. *Leche cruda y productos lácteos crudos. Riesgos y Recomendaciones*. [en línea]. [Consulta: 29 diciembre 2015]. Disponible en: <https://www.cdph.ca.gov/HealthInfo/discond/Documents/RawMilkFact%20SheetSpanish.pdf>

CELIS M y JUÁREZ D. *Microbiología de la leche*. [en línea]. 2009 [Consulta: 12 octubre 2015]. Disponible en: http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_micrb_09/microbiologia_leche.pdf

CERVANTES, Estrella; et al. *Características generales del Staphylococcus aureus* [en línea]. [Consulta: 22 enero 2016]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v44n5/14036.pdf>

CHOLCA GUATEMAL, Sonia Emerita. Análisis de la situación del uso de medicamentos (antibióticos y antiparasitarios) en las unidades productivas de los centros de acopio y enfriamiento de leche Sto. Domingo y Puliza (tesis).

Comisión del Codex Alimentarius. *Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en Alimentos* [en línea]. 2012. [Consulta: 06 enero 2016]. Disponible en: ftp://ftp.fao.org/codex/weblinks/MRL2_s_2012.pdf

CÚE, Manuela & MOREJÓN, Moisés. Antibacterianos de acción sistémica. Parte II. Otros grupos de antibióticos. *Med Gen Integr* [en línea], 1998, (Cuba) 14 (4). [Consulta: 20 enero 2016]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol14_4_98/mgi09498.htm

DÁVILA, J. *Evaluación microbiológica de las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso tipo Gouda* [en línea], 2006 (Venezuela) 56 (1). [Consulta: 20 enero 2016]. Disponible en: http://www.alanrevista.org/ediciones/2006-1/evaluacion_microbiologica_queso_gouda.asp

Diario Los Andes. *El mercado San Alfonso mantiene su estructura* [en línea]. [Consulta: 11 enero 2016]. Disponible en: <http://www.diariolosandes.com.ec/index.php/noticias/comunidad/9252-el-mercado-san-alfonso-mantiene-su-infraestructura>

DIBICO. *Agar para Métodos Estándar*. [en línea]. [Consultado: 09 enero 2016]. Disponible en: <http://www.dibico.com/fichast/1020.pdf>

Ecured. *Eritromicina*. [en línea]. [Consulta: 10 enero 2016]. Disponible en: <http://www.ecured.cu/Eritromicina>

FARÍA, J; et al. Resistencia a los antimicrobianos y concentración inhibitoria mínima (CIM) de Enterobacterias aisladas de leche cruda. *FCV-LUZ* [en línea], 1998, (Venezuela) 3 (4), pp. 315-322. [Consulta 22 enero 2016]. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27124/2/articulo4.pdf>

FARÍA, J; et al. Resistencia a los antimicrobianos de Staphylococcus aislados de leche cruda. *FCV-LUZ* [en línea], 1999, (Venezuela) 9(4), pp. 343-348. [Consulta: 23 enero 2016]. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27202/2/articulo12.pdf>

FARÍA, J; et al. Agentes Bacterianos y Contaje de células somáticas en leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual o mecánica en cuatro fincas lecheras del Estado Zulia, Venezuela. *FCV-LUZ* [en línea], 2005 (Venezuela) 15 (1), p.64-71. [Consulta: 22 enero 2015]. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/28292/2/art9.pdf>

FARÍA, J; et al. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. *FCV-LUZ* [en línea], 2005, (Venezuela) 15(3), pp. 227-234. [Consulta: 23 enero 2016]. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/28313/2/art5.pdf>

FDA: Food and Drug Administration. *Los peligros de la leche cruda* [en línea]. 2012. [Consulta: 29 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM316383.pdf>

FUENTES, Gerardo; et al. Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación. *Agricultura, sociedad y desarrollo* [en línea], 2013 (México)

10 (4). [Consulta: 20 enero 2016]. ISSN 1870-5472. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-54722013000400003&script=sci_arttext
García, P; et al. *Microbiología Clínica Aplicada*. 3ª ed. España-Madrid: Díaz de Santos, 1997, p.38

García, P; et al. *Microbiología Clínica Aplicada*. 3ª ed. España-Madrid: Díaz de Santos, 1997, p.113

GIL HA. *Tratado de Nutrición. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. 2da ed. Madrid-España: Medica Panamericana, 2010, pp. 11-14

HEER EG. *Microbiología de la leche*. [en línea]. 2015. [Consulta: 11 octubre 2015]. Disponible en: <http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/tecnologialeche/informacion/microbiologia.pdf>

HERNÁNDEZ, CH. *Fundamentos de Epidemiología*. Costa Rica-San José: EUNED, 2002, pp. 63-64

HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, M & SASTRE GALLEGOS, A. *Tratado de Nutrición*. Madrid-España: Díaz de Santos, 1999, p. 377-388

Instituto Nacional de Salud. *Identificación de riesgos químicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia* [en línea]. [Consulta: 29 noviembre 2015]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-peligros-quimicos-en-leche.pdf>

LUIGI, T. Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada expandida en el estado Carabobo, Venezuela. *Salus* [en línea], 2012 (México) 17 (1), pp.237-252. [Consulta: 21 enero 2016]. ISSS 1316-7138. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1316-71382013000100006&script=sci_arttext

MAG, IICA. *Manual de procedimientos para el control microbiológico de los alimentos* [en línea]. Paraguay-Asunción, 2011. [Consulta: 18 agosto 2015]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=HcsOAQAIAAJ&pg=PA46&dq=coliformes+totales+en+alimentos&hl=es&sa=X&ved=0CCAQ6AEwAWoVChMIxIzLsGjxwIVyKoeCh34WgGE#v=onepage&q=coliformes%20totales%20en%20alimentos&f=false>

MAGARIÑOS H. *Producción Higiénica de la leche cruda* [en línea]. 2000. [Consulta: 29 diciembre 2015]. Disponible en: <http://portal.oas.org/LinkClick.aspx?fileticket=wlyuTwR3IEc%3D&tabid=585>

MARISCAL, P.C.A. Características Microbiológicas de Leche Cruda de Vaca en Mercados de Abasto de Trinidad Bolivia. *Agrociencias Amazonía* [en línea], 2013 (Bolivia) 1 (2). [Consulta 18 enero 2016]. ISSN 2307-9606. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2307-96062013000200002&script=sci_arttext&tlng=es

MARTÍNEZ, Ailin. Calidad e inocuidad en leche cruda de una cadena de producción de una provincia occidental de Cuba. *Revista de Salud Animal* [en línea], 2015 (Cuba) 37 (2). [Consulta: 19 enero 2016]. ISSN 2224-4700. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2015000200002&script=sci_arttext

MARTÍNEZ, D; et al. *Resistencia de las bacterias causantes de mastitis bovina frente a los antimicrobianos más frecuentes* [en línea]. 2013. [Consulta 23 enero 2016]. Disponible en: <file:///C:/Users/Marilin/Downloads/273-1111-1-PB.pdf>

MARTÍNEZ, Marcela & GÓMEZ, Carlos. Calidad Composicional e Higiénica de la leche cruda recibida en Industrias Lácteas de Sucre, Colombia. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* [en línea], 2013 (Colombia) 11 (2). [Consulta: 22 enero 2016]. ISSN 1692-3561. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692-35612013000200011&script=sci_arttext&tlng=es

Materias primas pecuarias. *Microbiología de la leche cruda* [en línea]. 2010 [Consultado: 13 octubre 2015]. Disponible en: <https://materiasprimaspecuariasmyblog.files.wordpress.com/2010/07/material-micro-leche.doc>

MÁTTAR, Salimm; et al. Detección de antibióticos en leches: Un problema de salud pública. *Rev. salud pública* [en línea], 2009, (Colombia) 11 (4), pp. 579-590. [Consulta: 08 enero 2016]. Disponible en: <http://www.scielosp.org/pdf/rsap/v11n4/v11n4a09.pdf>

MOLINERI, A.I. Calidad Bacteriológica y Relación entre Grupos Bacterianos en Leche de Tanque de Frío. *FAVE-Ciencias Veterinarias* [en línea], 2009 (Argentina) 8 (2), pp. 75-86. [Consulta: 18 enero 2016]. ISSN 1666-938X. Disponible en:

<https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/publicaciones/index.php/FAVEveterinaria/article/viewFile/1490/2379>

MORAGAS, Manuel & DE PABLO, María. *Recopilación de Normas Microbiológicas de los Alimentos y Asimilada y otros Parámetros Físico-Químicos de Interés Sanitario* [en línea]. 2004. [Consulta: 22 enero 2016]. Disponible en: http://www.euskadi.eus/gobierno-vasco/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/es_1247/adjuntos/alim_recopilacionmicro.pdf

MORENO, Fausto. Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (Departamento de Boyacá). *Revista de Medicina Veterinaria* [en línea], 2007 (Colombia) 14. [Consulta: 19 enero 2016]. Disponible en: <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/1802>

NOVARTIS. Salvando, prolongando y mejorando la vida de los animales apasionadamente [en línea]. [Consulta: 11 enero 2016]. Disponible en: http://www.agrytec.com/pecuario/images/stories/auspiciantes.secundarios/ecuaquimica/novartis_ganaderia.pdf

NTE INEN 0009. *Leche cruda. Requisitos.*

NTE INEN 1529-2. *Control Microbiológico de los Alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.*

NTE INEN 1529-5. *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos.*

NTE INEN 1529-6. *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable.*

NTE INEN 1529-8. *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes totales y E. coli.*

OMS: Organización Mundial de la Salud. *Problemas de salud pública relacionados con el uso de antibióticos en los alimentos y en los piensos* [en línea]. 1963 [Consulta: 21 octubre 2015]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37495/1/WHO_TRS_260_spa.pdf

OMS: Organización Mundial de la Salud [en línea]. 2015. [Consulta: 23 enero 2016]. Resistencia a los antimicrobianos. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>

PAHO. Coliforme Total. Determinación del número más probable de coliforme total por la técnica de los tubos múltiples. [en línea]. [Consulta: 09 enero 2016]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan/013761/013761-02.pdf>

PARRA, Helena; et al. *Los residuos de medicamentos en la leche. Problemática y estrategias para su control*. [en línea]. Colombia-Neiva: 2003 [Consulta: 21 octubre 2015]. Disponible en: http://agronet.gov.co/www/docs_si2/20061024154510_control%20estrategico%20residuos%20medicamentos%20en%20la%20leche.pdf

PASCUAL ANDERSON, María & Calderón, Vicente. *Microbiología Alimentaria*. 2da ed. España-Madrid: Díaz de Santos, 2000, p.13

PÉREZ RD. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* [en línea], 1998, (Colombia) 22 (3), pp. 57-67. [Consulta: 20 octubre 2015]. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>

PEV: Prontuario de Especialidades Veterinarias. *Clindamicina* [en línea]. [Consulta: 10 enero 2016]. Disponible en: <http://www.diccionarioveterinariopl.m.com/clindamicina-1545-2>

Placas Petrifilm 3M. [en línea]. [Consulta: 08 enero 2015]. Disponible en: <http://www.vectorecuador.com/placas-petrifilm-3m/>

Prats G. *Microbiología Clínica*. España-Madrid: Médica Panamericana, 2005, p.30

Reglamento Técnico RTCR; 401-2006. *Leche cruda y Leche Higienizada*

REYES GG; et al. *Calidad de la leche cruda* [en línea]. 2010. [Consulta: 13 octubre 2015]. Disponible en: http://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/CALIDADDELALECHECRUDA.pdf

RIMONDI M. *Leche cruda intensa y peligrosa*. [en línea]. [Consulta: 12 octubre 2015]. Disponible en: <http://www.infortambo.com/admin/upload/arch/Leche%20cruda.pdf>

ROBALINO, M. Las Plazas, mercados y vendedores ambulantes de Riobamba: una oportunidad para construir el buen vivir [en línea]. 2009. [Consulta: 11 enero 2016]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/taniatixi8246/propuesta-de-los-mercados>

RODRÍGUEZ, Ángel; et al. Tetraciclinas. *Acta Médica* [en línea], 1998, 8 (1), p. 75-79. [Consulta: 10 enero 2016]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act11198.pdf

RODRÍGUEZ, Evelin; et al. *Bacteriología General. Principios y Prácticas de Laboratorio*. [en línea]. [Consulta: 08 enero 2016]. Disponible en:

<https://books.google.com.ec/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA141&dq=placas+petrifilm&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjc6PiGv6DKAhXChZAKHZpgCEIQ6AEIzAA#v=onepage&q=placas%20petrifilm&f=false>

RODRÍGUEZ, G. Principales características y diagnósticos de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública Mex* [en línea], 2002 (México), pp. 464-475. [Consulta: 23 enero 2016]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v44n5/14036.pdf>

RODRÍGUEZ, Virginia. Calidad de leches crudas en empresas ganaderas doble propósito en el departamento de Córdoba (Colombia) en condiciones de máxima precipitación. *Revista Veterinaria y Zootecnia* [en línea], 2015 (Colombia). [Consulta: 20 enero 2016]. Disponible en: <http://200.21.104.25/vetzootec/index.php/ultimo-numero?id=104>

unsa.edu. *Leche y derivados*. [en línea]. [Consulta: 12 octubre 2015]. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/14%20leche%20y%20derivados.pdf>

ROIG, A. Riesgos y peligros en los productos lácteos. [en línea]. Barcelona: 2004. [Consulta: 29 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2004/08/11/13957.php>

ROJAS, Jenny. Estudio preliminar de aerobios mesófilos en leche cruda que se expende en carros repartidores en la Ciudad de Cuenca [en línea] (tesis). (Maestría) Universidad del Azuay, Cuenca. 2013. p.24. [Consulta: 21 enero 2016]. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/3206/1/09980.pdf>

SAGARDOY, Marcelo & MANDOLESI, María. *Biología del Suelo. Guía de Estudio*. Bahía Blanca-Argentina: Universidad Nacional del Sur, 2004, p. 39

SANI. Vademecum Veterinario. *Ampiline* [en línea]. [Consulta: 10 enero 2016]. Disponible en: http://www.sani.com.ar/producto.php?id_producto=124

SIGNORINI, Marcelo; et al. Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de leche. *FCV-LUZ* [en línea], 2008, (Argentina) 13 (2), pp.207-217. [Consulta: 22 enero 2016]. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/23640/2/articulo12.pdf>

SUSSMANN, Alberto; et al. *Resistencia bacteriana*. [en línea]. [Consulta: 06 enero 2016] Disponible en: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>

TORTORA; et al. *Procariontes: dominios Bacteria y Archaea. Introducción a la Microbiología*. 9na ed. Argentina-Buenos Aires: Médica Panamericana, 2007, p. 323

UNAM. *Límites máximos permisibles para productos microbiológicos* [en línea]. [Consulta: 29 enero 2016]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Limitespermisibles_18844.pdf

UNAM. *Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y Escherichia coli por la técnica de diluciones en tubo múltiple (número más probable o NMP)*. [en línea]. [Consulta: 10 enero 2016]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Analisis_Agua_NMP_22309.pdf

Unión Europea. *Reglamento (UE) N° 32/2010 Comisión del 22 de diciembre del 2009*. [en línea]. [Consulta: 06 enero 2016]. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_es.pdf

Universidad Politécnica Salesiana, Cayambe, Ecuador. 2011. P. 78. [Consulta: 23 enero 2016]. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/3727/6/UPS-YT00130.pdf>

VADEMECUM. *Kanamicina* [en línea]. [Consulta: 10 enero 2016]. Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/k001.htm>

VALDOVINOS, Juan & FABELA, Cynthia. *Cefalosporinas* [en línea]. [Consulta: 10 enero 2016]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/lucifr08/medicina-veterinaria-y-cefalosporinas>

VALERO, K; et al. Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en leche de bovinos con mastitis subclínica y leche de tanque. *Revista Científica* [en línea], 2010, (Venezuela) 20 (4). [Consulta: 23 enero 2016]. ISSN 0798-2259. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-22592010000400006&script=sci_arttext

VARGAS T. Calidad de la leche: visión de la Industria Láctea [en línea]. [Consulta: 21 enero 2016]. Disponible en: http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/xcongreso/P297_CalidadLeche.pdf

VARGAS T. *Calidad e Inocuidad de la leche y productos lácteos* [en línea]. [Consulta: 13 octubre 2015]. Disponible en:

<http://www.cavilac.org/Informacion/Documentos/IIIForoVenezolanodelaleche/Calidad%20e%20Inocuidad%20de%20la%20leche%20y%20productos%20lacteos.pdf>

WALSTRA, Pieter. *Química y Física Lactológica*. Zaragoza-España: ACRIBIA, 1984, pp. 182-183

ZARAGOZA; et al. *Microbiología Aplicada al Paciente Crítico*. España-Madrid: Medica Panamericana, 2007, p.5

ANEXOS

Anexo A: Norma INEN 0004: Leche y Productos Lácteos. Muestreo.

1. OBJETO

1.1 Esta norma establece los procedimientos para la extracción de muestras de leche y productos lácteos.

2. TERMINOLOGIA

2.1 **Partida.** Es la cantidad de material de características similares que satisface totalmente un pedido.

2.2 **Lote.** Es cualquier cantidad de material de características similares, provenientes de una fuente común.

2.3 **Unidad de muestreo.** Es una porción de material o un artículo individual, extraído al azar de un lote.

2.4 **Muestra.** Es el conjunto de unidades de muestreo que se usa como información de la calidad de un lote.

3. DISPOSICIONES GENERALES

3.1 Tamaño de la muestra

3.1.1 En casos de discrepancia o litigio, deberán tomarse las muestras de un mismo lote.

3.1.2 Podrá usarse como unidad de muestreo el contenido total de un envase pequeño destinado a la venta al por menor, en cuyo caso el envase original no deberá abrirse o alterarse.

3.1.3 Para productos envasados en recipientes voluminosos, cada muestra deberá integrarse seleccionando al azar el número de recipientes indicados en la Tabla 1, extrayendo de cada uno de ellos una unidad de muestreo de masa o volumen igual al especificado para cada producto en el capítulo 5.

TABLA 1. Muestreo para unidades voluminosas

Tamaño del lote	Unidades para muestreo
1	1
2 - 5	2
6 - 60	3
61 - 80	4
81 - 100	5
más de 100	*

* 4, más 1 por cada 2 500 unidades adicionales o fracción de tal cantidad.

(Continúa)

3.1.4 Para productos envasados o empacados en recipientes o unidades pequeñas, cada muestra deberá formarse extrayendo al azar el número de unidades o recipientes indicados en la Tabla 2; cada unidad -o envase constituirá una unidad de muestreo (ver 3.1.2).

TABLA 2. Muestreo para unidades pequeñas

Tamaño del lote	Unidades para muestreo
menos de 100	1
101 - 1 000	2
1 001 - 10 000	3
más de 10 000	*
* 4, más 1 por cada 2 500 unidades adicionales o fracción de tal cantidad	

3.2 Condiciones pequeñas al muestreo

3.2.1 Deberá fijarse a cada muestra una tarjeta que incluya un número de identificación y la fecha de muestreo.

3.2.2 Los envases o empaques que contengan las unidades de muestreo deberán sellarse y marcarse con las rúbricas de las partes interesadas, y deberá suscribirse una acta de muestreo que incluya la siguiente información:

- a) número de la norma INEN de referencia: INEN 4.
- b) número de identificación de la muestra,
- c) fecha de muestreo,
- d) nombre del producto y marca comercial,
- e) identificación del lote o de la partida;
- f) masa o volumen total del lote o de la partida;
- g) número de unidades de muestreo obtenidas;
- h) lugar de procedencia del producto,
- i) lugar de toma de las muestras,
- J) observaciones que se consideren necesarias, y
- k) nombres, firmas y direcciones de las partes interesadas.

3.2.3 Las tres muestras deberán destinarse, respectivamente, al fabricante o distribuidor, a un laboratorio de análisis y a la entidad que deba actuar en caso de discrepancia.

3.2.4 La muestra destinada al laboratorio deberá enviarse tan pronto como sea obtenida, tomando precauciones durante el transporte para que no haya exposición directa del producto a la luz y para que la temperatura no sea menor de 0°C ni mayor de 10°C. Cuando las muestras sean destinadas a examen microbiológico, deberá usarse un recipiente aislado que permita mantener una temperatura comprendida entre 0°C y 5°C, excepto en el caso de productos lácteos en conserva envasados en sus recipientes originales, o en el caso de distancias cortas de transporte. Las muestras de queso deberán mantenerse en condiciones que eviten la separación de grasa o humedad, y el queso fresco deberá mantenerse siempre a una temperatura comprendida entre 0°C y

3.2.5 Para resolver en casos de discrepancia, las muestras restantes deberán almacenarse en refrigerador (ver 3.2.6) a una temperatura comprendida entre 0°C y 5°C, durante un tiempo no mayor de siete días si los ensayos no son microbiológicos, y 24 h si son microbiológicos; al cabo de este tiempo las muestras deberán eliminarse adecuadamente.

3.2.6 Podrá añadirse un preservador adecuado a las muestras de productos líquidos o quesos, cuando éstas se destinan a análisis químico o físico, siempre que el mismo no interfiera con el análisis. En tales casos, la naturaleza del preservador y la cantidad añadida deberán indicarse en la etiqueta de la muestra y en cualquier informe relativo al muestreo. No deberán añadirse preservadores a las muestras de productos sólidos o semisólidos (excepto queso) o a las muestras destinadas a ensayos microbiológicos.

3.2.7 Las unidades de muestreo podrán mezclarse antes del análisis o examinarse individualmente, según el criterio del laboratorio de análisis o por solicitud expresa de las partes interesadas.

4. INSTRUMENTAL

4.1 Características generales

4.1.1 El instrumental destinado a tomar muestras para análisis químico, físico o fisicoquímico, deberá estar completamente limpio y seco.

4.1.2 El instrumental destinado a tomar muestras para análisis microbiológico deberá estar completamente limpio y seco; además, deberá esterilizarse mediante uno de los métodos siguientes:

- a) Exposición al aire caliente a 170°C durante 2 horas. Después de esta operación, el instrumental podrá guardarse si se mantiene condiciones estériles.
- b) Exposición al vapor a 120°C, en autoclave, durante 20 min. Después de esta operación, el instrumental podrá guardarse si se mantienen condiciones estériles.
- c) Exposición al vapor a presión atmosférica durante 1,5 horas. Después de esta operación, el equipo deberá usarse el mismo día.
- d) Inmersión al alcohol etílico al 70% (V/V) y exposición a la llama hasta eliminar el alcohol, inmediatamente antes del uso.
- e) Exposición a una llama de gas (propano, butano), inmediatamente antes del uso, de modo que todas las superficies útiles del instrumental entren en contacto con la llama.

La elección del método de esterilización dependerá de la naturaleza, forma y tamaño del instrumental, y de las condiciones del muestreo. Se recomienda emplear, siempre que sea posible, el método a) ó el b).

4.1.3 Los envases destinados a contener muestras líquidas deberán reunir las siguientes características:

- a) ser de vidrio resistente a los métodos de esterilización descritos en 4.1.2;
- b) tener forma y capacidad adecuadas para contener la muestra o la unidad de muestreo y permitir su mezcla mediante agitación;

- c) estar provistos de cierre hermético que evite la contaminación o alteración del producto. El cierre puede ser tapón de caucho o plástico, o tapa roscada de metal inoxidable o plástico, revestida interiormente con un sello de material plástico, impermeable, insoluble, no atacable por las grasas y que no influya en el olor, sabor o composición del producto;
- d) si se usan tapones de caucho, éstos deben cubrirse con un material plástico adecuado antes de colocarlos y presionarlos en el recipiente.

4.1.4 Los envases destinados a contener muestras sólidas o semisólidas deberán reunir las siguientes características:

- a) ser de vidrio o de material plástico resistente a los métodos de esterilización descritos en 4.1.2;
- b) tener boca ancha y capacidad adecuada para recibir y contener la muestra o la unidad de muestreo, y permitir su mezcla mediante agitación;
- c) estar provisto de cierre hermético que evite la contaminación o alteración del producto; el cierre debe ser tapa roscada de metal inoxidable o plástico, revestida interiormente con un sello de material plástico, impermeable, insoluble, no atacable por las grasas y que no influya en el olor, sabor o composición del producto.

4.1.5 El instrumental usado para la mezcla del producto y la extracción de muestras será, preferentemente, de acero inoxidable o aluminio, pero podrá usarse otros materiales adecuados (ejemplo: material estañado). Todas las superficies deberán ser lisas y no presentar hendiduras o salientes. Cuando existan soldaduras, éstas deberán ser capaces de resistir una temperatura de esterilización de 180°C.

4.2 Dispositivos

4.2.1 *Agitador de disco pequeño.* Construido de acuerdo a la figura A.1 para productos contenidos en recipientes de varios litros de capacidad.

4.2.2 *Agitador de disco grande.* Construido de acuerdo con la figura A-2 para productos contenidos en recipientes, tanques o depósitos de gran capacidad.

4.2.3 *Sacamuestras para mantequilla.* Similar al indicado en la figura A.3, de longitud suficiente para atravesar al recipiente que contiene el producto, diagonalmente hasta su base.

4.2.4 *Sacamuestras para queso.* Similar al indicado en la figura A.4 de dimensiones adecuadas al tipo de queso que debe muestrearse.

4.2.5 *Sacamuestras para leche en polvo.* Similar al indicado en la figura A.5. Debe tener un largo comprendido entre 40 y 50 cm y un diámetro exterior de aproximadamente 40 mm, y estar formado por dos tubos concéntricos de aluminio provistos de ranuras que puedan abrirse o cerrarse al girar el tubo interior. El tubo exterior debe terminar en punta para facilitar la penetración.

4.2.6 *Cucharón,* de capacidad no menor de 85 cm³ (ver figura A.6).

4.2.7 *Cucharas,* de acero inoxidable.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Leche y productos lácteos líquidos. (exceptuando la leche condensada y la leche evaporada). Debe aplicarse el siguiente procedimiento:

5.1.1 Mezclar completamente el producto, transvasándolo varias veces de un recipiente a otro, o agitándolo adecuadamente con un agitador de disco (ver 4.2.1 y 4.2.2).

5.1.2 En el caso de muestrear crema, debe usarse uno de los agitadores de disco (ver 4.2.1 y 4.2.2), según el tamaño del recipiente, sumergiéndolo un número suficiente de veces para asegurar una mezcla completa del producto. El agitador debe moverse cuidadosamente para evitar la formación de espuma o el efecto del batido.

5.1.3 Inmediatamente después de la agitación, tomar una unidad de muestreo no menor de 200 cm³ mediante un cucharón y transferirla a un envase adecuado (ver 4.1.4).

5.1.4 Si hay dificultades para homogeneizar el producto, deben mostrarse porciones de diferentes lugares del recipiente hasta totalizar la cantidad requerida.

5.1.5 Si el producto está envasado en recipientes pequeños para la venta, la muestra debe formarse de acuerdo con lo indicado en 3.1.4, y los recipientes no deben abrirse hasta el momento del análisis.

5.2 Leche condensada y leche envasada. Debe aplicarse el siguiente procedimiento:

5.2.1 Si el producto está contenido en recipientes voluminosos, mezclar el contenido del recipiente usando un agitador de disco (ver 4.2.1 y 4.2.2) u otro dispositivo adecuado, cuidando de raspar e incorporar el material adherido a la pared y al fondo del recipiente. Extraer, con un cucharón o un dispositivo adecuado, 2 a 3 litros del producto y transferirlos a un recipiente más pequeño, repetir la agitación, tomar una unidad de muestreo no menor de 200 cm³ y guardarla en un envase adecuado (ver 4.1.4).

5.2.2 Si el producto está envasado en recipientes pequeños para la venta, la muestra debe formarse de acuerdo con lo indicado en 3.1.4 y los recipientes no deben abrirse hasta el momento del análisis.

5.3 Leche en polvo y productos lácteos en polvo. Debe realizarse primero el muestreo para examen microbiológico y luego, sobre el mismo recipiente, el muestreo para análisis químico y examen organoléptico. Deben aplicarse los siguientes procedimientos:

5.3.1 *Muestreo para examen microbiológico.* Usando una cuchara estéril (ver 4.1.2) de acero inoxidable, retirar la capa superior de polvo de la zona de muestreo. Con otra cuchara estéril, tomar una unidad de muestreo de 50 a 200 g. de ser posible de un punto cercano al centro del recipiente. Transferir la porción extraída, tan pronto

(Continúa)

como sea posible y en condiciones asépticas, a un envase estéril adecuado (ver 4.1.4) de color ámbar si es transparente. El envase debe cerrarse inmediatamente. En caso de litigio sobre las condiciones bacteriológicas de la capa superficial del producto, debe tomarse una muestra especial de esta capa.

5.3.2 Muestreo para análisis químico y examen organoléptico. Introducir el sacamuestras para leche en polvo (ver 4.2.3) con velocidad uniforme a través del producto. Cuando el tubo llega al fondo del recipiente, girar el tubo interior para cerrar las ranuras, sacar el aparato y transferir la porción extraída a un envase adecuado (ver 4.1.4). El producto no debe tocarse con las manos, y la operación debe repetirse hasta completar una unidad de muestreo de 300 g a 500 g.

ANEXO B: Normas Microbiológicas de la leche cruda

Anexo B1. Norma INEN 0009. Leche cruda. Requisitos Microbiológicos de la leche cruda tomada en hato.

Requisito	Límite máximo	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aeróbios mesófilos REP, UFC/cm ³	1,5 x 10 ⁶	NTE INEN 1529-5
Recuento de células somáticas/cm ³	7,0 x 10 ⁵	AOAC – 978.26

Anexo B2. Parámetros microbiológicos para leche fluida permitidos en leche que se comercializa directamente para el consumo humano.

Parámetro	Plan de muestreo			Límite	
	Clase	n	C	m	M
Coliformes totales	3	5	2	500UFC/ml	2000UFC/ml
Salmonella spp/25 g	2		0		Ausencia
Listeria monocytogenes/25 g	2		0		Ausencia
Staphylococcus aureus	3		2	100UFC/ml	500UFC/ml
coliformes fecales	3		2	10 UFC/ml	100 UFC/ml

ANEXO C: Norma NTE INEN 1529-6. Control microbiológico de los alimentos.
Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable

1. OBJETO

1.1 Esta norma establece la técnica del número más probable para la determinación de microorganismos coliformes.

2. TERMINOLOGIA

2.1 Coliformes (coli aerógenos). Bacterias de forma bacilar, Gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas móviles e inmóviles, no esporuladas que en presencia de sales biliares u otros agentes selectivos equivalentes fermentan la lactosa con producción de ácido y gas cuando se incuban a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ los productos refrigerados y a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ los productos que se mantienen a temperatura ambiente y se utiliza el medio y método descrito. Este grupo es utilizado como indicador del grado de higiene.

2.2 Recuento de coliformes. Es la determinación del número de coliformes viables por gramo o cm^3 de muestra de alimento.

3. RESUMEN

3.1 El método se basa en la determinación del número más probable (NMP) por la técnica de dilución en tubos, utilizando el medio líquido selectivo caldo verde brillante bilis-lactosa o similar para el ensayo presuntivo y los tubos que presentan gas son confirmados en agar Eosina azul de metileno (E M B). La temperatura de incubación para el ensayo presuntivo y confirmativo es $30 \pm 1^\circ\text{C}$, para productos refrigerados y $35 \pm 1^\circ\text{C}$ para productos que se mantienen a temperatura ambiente.

4. EQUIPO Y MATERIAL DE VIDRIO

4.1 Equipo usual en un laboratorio microbiológico. En particular

4.1.1 Pipetas serológicas de punta ancha de 1, 5 y 10 cm^3 graduadas en 1/10 de unidad.

4.1.2 Cajas petri

4.1.3 Tubos de 150 x 16 mm y de 125 x 12 mm

4.1.4 Tubos Durhan de 50 x 6 mm

4.1.5 Erlenmeyer de 500 y $1\,000 \text{ cm}^3$

4.1.6 Frascos de boca ancha de 250, 500 y 1 000 cm³ con tapa de rosca autoclavable.

4.1.7 Asa de inoculación

4.1.8 Gradillas

4.1.9 Balanza de capacidad no inferior a 2 500 g y de 0,1 g de sensibilidad

4.1.10 Incubador regulable, rango de temperatura de 25 - 70 ± 1 °C

4.1.11 Autoclave

4.1.12 pH-metro

5. MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTE

5.1 Caldo verde brillante bilis-lactosa (BGBL); ver preparación caldos de cultivo en la Norma INEN 1529-1

5.2 Agar eosina azul de metileno (EMB), ver preparación agares en la Norma INEN 1 529-1.

5.3 Solución de Peptona al 0,1% ver preparación diluyentes en la Norma INEN 1 529-1 .

6. PREPARACION DE LA MUESTRA

6.1 Preparar la muestra según uno de los procedimientos indicados en la Norma INEN 1 529-2.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Inmediatamente después de realizadas las diluciones con una pipeta estéril, transferir 1 cm³ de la dilución 10⁻¹ a cada uno de los tres tubos que contengan 10 cm³ de caldo BGBL o similar (5.1) (ver esquema 1).

7.2 Con otra nueva pipeta estéril, transferir 1 cm³ de la dilución 10⁻² en cada uno de los tres tubos que contengan 10 cm³ del medio. Proceder de igual manera con otras diluciones.

7.3 Incubar los tubos a 30 ± 1 °C para productos refrigerados y 35 ± 1 °C para productos que se mantiene a temperatura ambiente por 48 horas.

7.4 Transcurridas las 48 horas anotar en cada dilución como presuntos positivos todos los tubos que presenten crecimiento con producción suficiente de gas como para llenar el fondo cóncavo del tubo Durham

es decir, el menisco llegaría hasta donde las paredes del tubo se hacen paralelas. También se considera como presunto positivo si el tubo Durham contiene menos gas del indicado, pero al golpear delicadamente al tubo de cultivo hay desprendimiento de burbujas. Solo la turbidez no es indicativo de una prueba positiva.

7.5 Agitar cada uno de los tubos presuntamente positivos y con un asa de inoculación a partir de cada uno de ellos sembrar por estría en la superficie de placas individuales secas de Agar EMB (5.2), identificar las placas.

7.6 Invertir las placas e incubarlas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ para productos refrigerados y $35 \pm 1^\circ\text{C}$ para productos que se mantienen a temperatura ambiente por 24 ± 2 horas.

7.7 Si al término del período de incubación hay desarrollo de colonias lactosa positivas las cuales son negras o poseen centro oscuro con periferias transparentes incoloras o bien colonias mucoides de color rosa naranja, confirman la presencia de coliformes.

7.8 De cada dilución anotar el número de tubos positivos confirmados de coliformes.

8. SELECCION DE DILUCIONES

8.1 Elegir la dilución más alta en la que la presencia de coliformes es confirmada en tres tubos y las dos diluciones superiores más próximas. Por ejemplo, si las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} presentan resultados positivos confirmados en los tres tubos, la 10^{-3} presenta un tubo y 10^{-4} ninguno, anotar los resultados de la siguiente manera:

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
3/3	1/3	3/3	0/3

Las diluciones elegidas serán la 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} cuya relación de tubos positivos es 3-1-0 que según la Tabla 1 le corresponde un NMP de 43.

8.2 Si ninguna de las diluciones presenta tres tubos positivos confirmados seleccionar las tres diluciones más altas con algún tubo positivo. Por ejemplo, se tiene los siguientes datos:

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
2/3	2/3	1/3	1/3

Las diluciones que deben ser seleccionadas son las 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , dando una combinación de tubos positivos de 2-1-1 que según la Tabla 1 le corresponde un NMP de 20.

9. CALCULOS

9.1 Cuando las tres diluciones decimales sucesivas son las 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y se ha inoculado 3 alicuotas de 1 cm^3 de cada una de éstas, anotar la relación de tubos positivos confirmados y ver en la Tabla 1 el respectivo NMP/g ó cm^3 .

9.2 Para calcular el NMP/g ó cm^3 cuando se inocula tres alicuotas de 1 cm^3 de más de tres diluciones decimales sucesivas, multiplicar el NMP por el factor adecuado: 10, 100, 1 000, etc. Por ejemplo, si los tubos seleccionados corresponden a las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} , multiplicar por 100, multiplicar por 1 000 si las diluciones seleccionadas son 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} y así sucesivamente.

Completando los ejemplos de los literales 8.1 y 8.2 tenemos respectivamente: NMP de 430 coliformes/g ó cm^3 (43×10); NMP de 200 coliformes/g ó cm^3 (20×10).

9.3 Para el caso de productos con baja carga microbiana se puede utilizar soluciones más concentradas. En este caso, dividir el NMP para el factor adecuado. Por ejemplo, si al inocular 3 alicuotas de 10 cm^3 de la dilución 10^{-1} , 3 alicuotas de 1 cm^3 de la 10^{-1} y 3 alicuotas de 1 cm^3 de la 10^{-2} se obtiene una relación de tubos positivos confirmados de 3-2-1, a esta relación le corresponde un NMP de 150 que dividido para 10 se obtiene un NMP de 15 coliformes/g ó cm^3 de muestra.

9.4 Mayores detalles ver en la Norma INEN 1 529-4.

10. ERRORES DE METODO

10.1 El NMP es realmente una estimación del número de bacterias existentes en cualquier muestra, y esta estimación está sujeta a errores inherentes al método, aunque esto no invalida la idoneidad de la prueba para detectar la contaminación.

10.2 Las combinaciones de tubos positivos de las categorías 3-4 y las que no figuran en la Tabla 1, son muy poco probables y no pueden servir de base para decidir, devolver y/o reprocesar el producto.

10.3 Cuando frecuentemente se obtengan combinaciones improbables, revisar cuidadosamente el método y eliminar todas las probables causas de error (mezcla deficiente de la muestra y/o diluciones, presencia de inhibidores en los alimentos, etc.).

11. INFORME DE RESULTADOS

11.1 Reportar: NMP de coliformes/g ó cm^3 de muestra.

11.2 Indicar el método de ensayo. Mencionar cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido en el resultado. Incluir todos los detalles de identificación de la muestra.

TABLA 1. Índice del NMP de bacterias cuando se utiliza tres alícuotas de 1 cm³ por dilución.

NUMERO DE TUBOS POSITIVOS EN CADA DILUCION			NMP POR GRAMO O cm ³	LIMITE DE CONFIANZA DEL 95%		CATEGORIA
DILUCION 10 ⁻¹	DILUCION 10 ⁻²	DILUCION 10 ⁻³		INFERIOR	SUPERIOR	
0	0	0	0	-	-	-
0	0	1	3	0,5	9	3
0	1	0	3	0,5	13	2
1	0	0	4	0,5	20	1
1	0	1	7	1	21	3
1	1	0	7	1	23	2
1	1	1	11	3	36	4
1	2	0	11	3	36	3
2	0	0	9	1	36	1
2	0	1	14	3	37	3
2	1	0	15	3	44	2
2	1	1	20	7	89	4
2	2	0	21	4	47	3
2	2	1	28	10	150	4
3	0	0	23	4	120	1
3	0	1	39	7	130	2
3	0	2	64	15	380	4
3	1	0	43	7	210	1
3	1	1	75	14	230	2
3	1	2	120	30	380	3
3	2	0	93	15	380	1
3	2	1	150	30	440	2
3	2	2	210	35	470	3
3	3	0	240	36	1 300	1
3	3	1	460	71	2 400	1
3	3	2	1 100	150	4 800	1

ANEXO D: Almacenamiento y uso de Placas Petrifilm

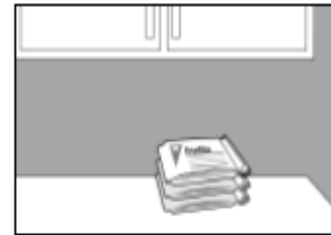
Almacenamiento



1 Almacene los paquetes cerrados a una temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$ ($\leq 46^{\circ}\text{F}$). Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente del lugar de trabajo antes de abrirlos. Las Placas Petrifilm tienen un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración. Observe la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.



2 Para cerrar un paquete abierto, doble el extremo y séllelo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.

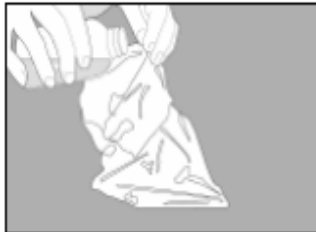


3 Mantenga los paquetes cerrados (según se indica en el punto 2) a temperatura $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ($\leq 77^{\circ}\text{F}$) y una humedad relativa $\leq 50\%$. No refrigere los paquetes que ya hayan sido abiertos. Utilice las Placas Petrifilm máximo 1 mes después de abierto el paquete. Para almacenamiento prolongado de paquetes abiertos, una vez cerrados (según punto 2) colóquelos en un contenedor sellable (tipo funda con cierre) y almacénelos en congelación. Para usar las placas, saque el paquete del congelador, retire el número de placas necesarias y guarde el resto en las mismas condiciones antes descritas hasta su fecha de caducidad.

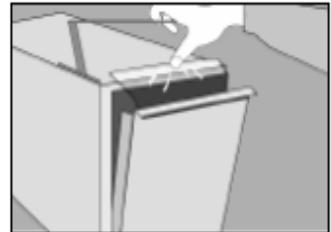
Preparación de la muestra



4 Prepare al menos una dilución de 1:10 de la muestra. Pese o pipetee la muestra en una funda o bolsa de Stomacher, botella de dilución o cualquier otro contenedor estéril apropiado.



5 Adicione la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/L de KH_2PO_4 y con pH ajustado a 7.2); agua de peptona al 0.1%; diluyente de sal peptonada (método ISO 6887); buffer de agua de peptona (método ISO 6579); solución salina (0.85 a 0.90%); caldo letheen libre de bisulfato o agua destilada.

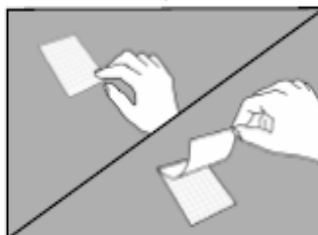


6 Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales.

Ajuste el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2. Para productos ácidos: use solución 1N de NaOH. Para productos básicos: use solución 1N de HCl.

No utilice buffers que contengan citrato, bisulfato o tiosulfato de sodio, porque pueden inhibir el crecimiento.

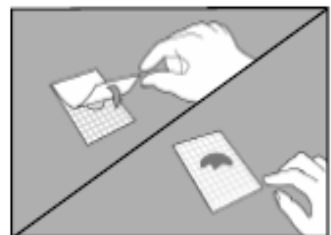
Inoculación



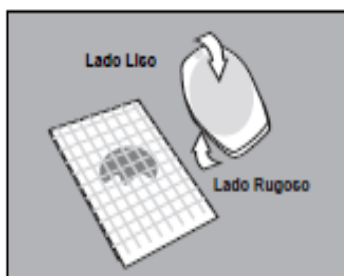
7 Coloque la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levante la lámina semitransparente superior.



8 Con la pipeta perpendicular a la Placa Petrifilm, coloque 1 ml de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.



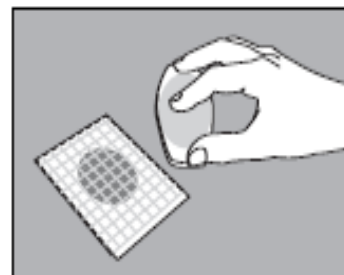
9 Libere la película superior dejando que caiga sobre la dilución. No la deslice hacia abajo.



10 Con el lado rugoso hacia abajo, coloque el dispensador o esparcidor sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.



11 Presione suavemente el dispensador o esparcidor para distribuir la muestra sobre el área circular. No gire ni deslice el dispensador. Recuerde distribuir la muestra antes de inocular una siguiente placa.



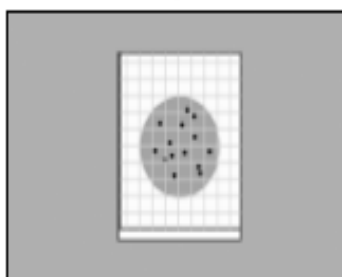
12 Levante el dispensador o esparcidor. Espere por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y proceda a la incubación.

Incubación



13 Incube las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

Interpretación



14 Las Placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Consulte la Guía de interpretación para leer los resultados.



15 Las colonias pueden ser aisladas para su identificación posterior. Levante la película superior y recoja la colonia del gel.

ANEXO E: Recolección, preparación y siembra de las muestras de leche cruda



Recolección y transporte de muestras



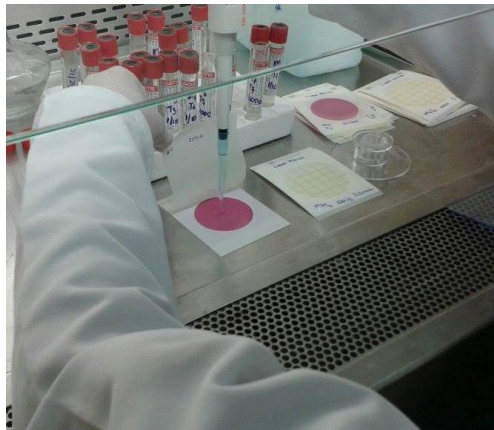
Colocación de muestras en frascos estériles



Preparación de la solución madre

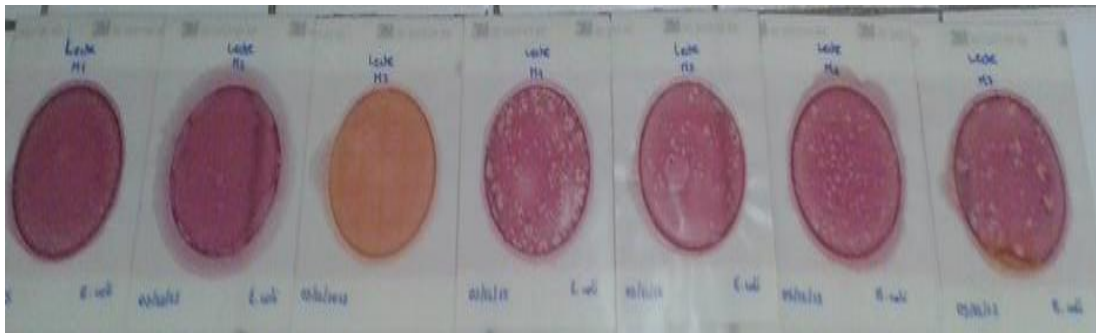


Preparación de diluciones



Siembra en placas Petrifilm

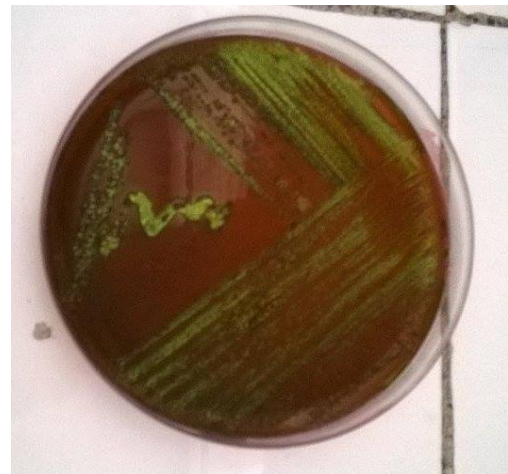
ANEXO F: Análisis microbiológico de Coliformes totales y *Escherichia coli*



Crecimiento de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de leche cruda



Crecimiento de colonias crema medianas en agar para métodos estándar

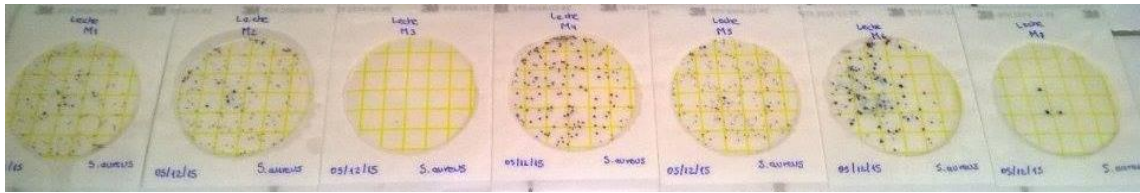


Crecimiento de *E. coli* en agar eosina azul de metileno



Prueba del Número más probable

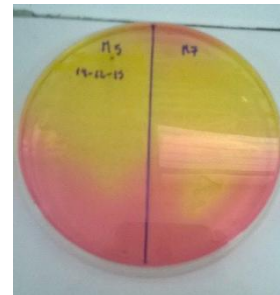
ANEXO G: Análisis microbiológico de *Staphylococcus aureus* y *Aerobios mesófilos*



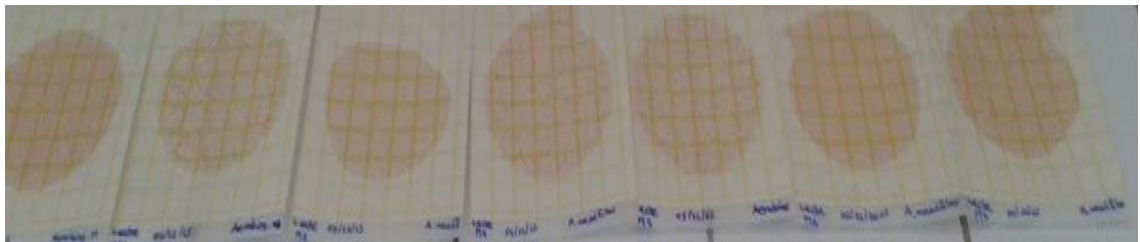
Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en placas Petrifilm



Fermentación del manitol



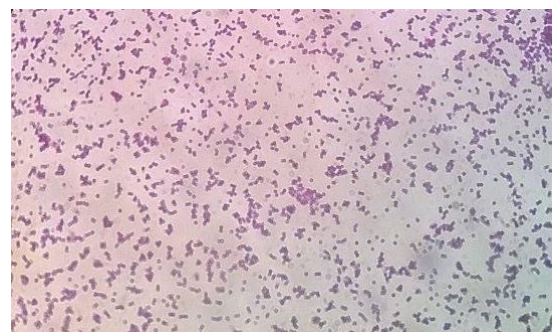
Fermentación del manitol



Crecimiento de aerobios mesófilos en placas Petrifilm

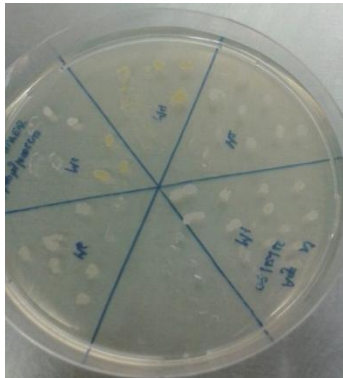


Bacilos gram negativos

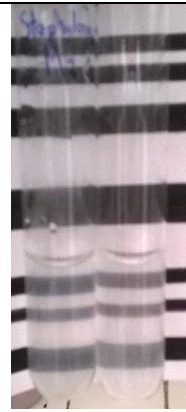


Cocos gram positivos

ANEXO H: Antibiograma



Aislamiento de bacterias en agar nutritivo



Comparación del inóculo con el Estándar McFarland



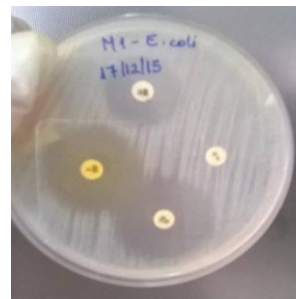
Siembra en agar Mueller- Hinton



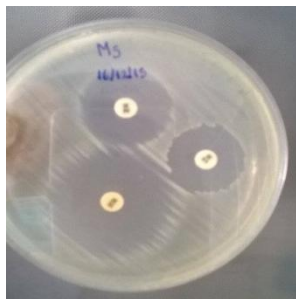
Colocación de Discos



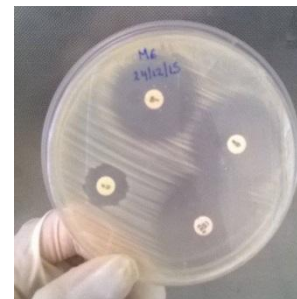
Medición de discos de antibióticos



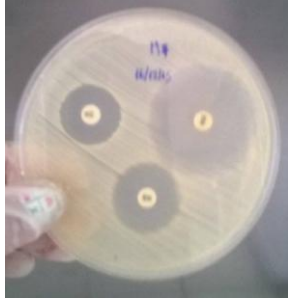
Halos de inhibición de *E. coli*



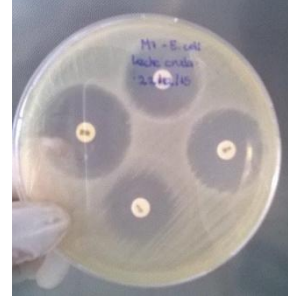
Halos de inhibición de *E. coli*



Halos de inhibición de *Staphylococcus aureus*.



Halos de inhibición de *Staphylococcus aureus*



Halos de inhibición de *E.coli*

Anexo I: Antibióticos más empleados en medicina veterinaria

GRUPO	ANTIBIÓTICO	PREPARADO COMERCIAL	INDICACIONES
Betalactámicos	Cefoperazona	Fortiperazone	mamitis
	Cefalexina	Rilexine tratamiento	mamitis
	Amoxicilina	Synulox LC	mamitis
	Cloxacilina	Bovigam lactación	mamitis
	Ampicilina	Bovigam lactación	mamitis
	Penetamato iohidrato	Mamyzin inyector	mamitis
	Bencilpenicilina	Tetra Delta	mamitis
	Cefquinoma	Cobactan LC	mamitis
Sulfamidas	Sulfadoxina, trimetoprim	Veterin Diftrim 24	Inf. respiratorias genitourinarias enteritis bacter.
	Sulfadimidina trimetoprim	Sulfatrimetoprim Bayer	Inf. respiratorias genitourinarias enteritis bacter.
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Terramicina 100 si	mamitis, metritis, neumonías...
	Tetraciclina	Tetravex si	neumonías, pasteurelosis...
Aminoglucósidos	Neomicina	Lincocin forte	mamitis
	Gentamicina	Gentamox	neumonías, diarreas, mamitis
	Kanamicina	Mamispra forte	mamitis
Lincosamidas	Lincomicina	Lincocin forte	mamitis
Macrólidos	Eritromicina	Eritroyet	cojeras, neumonías, mamitis
	Espiramicina	Mycogal 105	artritis, SRB, pielonefritis
	Tilosina	Tilosina 200	cojeras, metritis,artritis