



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD FISICOQUÍMICA Y
MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE CRUDA ALMACENADA EN
CENTROS DE ACOPIO DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORAS: MELISSA MARIBELL RAMIREZ ROBLES

PRISCILA LISSBETH LLUMAN MARCATOMA

DIRECTORA: Ing. PAOLA FERNANDA ARGUELLO HERNÁNDEZ M.Sc.

RIOBAMBA – ECUADOR

2020

© 2020, Melissa Maribell Ramírez Robles; Priscila Lissbeth Llumán Marcatoma

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.

Nosotras, Melissa Maribell Ramírez Robles y Priscila Lissbeth Llumán Marcatoma, declaramos que el presente trabajo de titulación es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autoras asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.



Riobamba, 19 de febrero de 2020

Melissa Maribell Ramírez Robles Priscila Lissbeth Llumán Marcatoma

110492507-6 060418090-1

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de titulación; tipo: Proyecto de investigación, “EVALUACIÓN DE LA CALIDAD FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE CRUDA ALMACENADA EN CENTROS DE ACOPIO DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO” realizado por las señoritas: Melissa Maribell Ramírez Robles y Priscila Lissbeth Llumán Marcatoma, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Mayra Jannet Espinoza Melendres 2020-02-19



PRESIDENTA DEL TRIBUNAL

Ing Paola Fernanda Arguello Hernandez MSc.



DIRECTORA DEL TRABAJO

2020-02-19

DE TITULACIÓN

Dra. Ana Karina Albuja Landi.



MIEMBRO DEL TRIBUNAL

2020-02-19

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por bendecirme siempre durante todo mi proceso formativo y darme la fuerza para llegar a cumplir mis sueños. A mis padres José y Teresa, quienes con su amor, trabajo y sacrificio me apoyaron incondicionalmente para terminar con éxito mi carrera. A todos mis hermanos, especialmente a Cindy y Priscilla, quienes con sus consejos me han ayudado a afrontar los retos que se me han presentado. Así mismo, agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional, a mi tutora de tesis, Ing. Paola Arguello y a la Dra. Anita Albuja quienes, con su amistad, experiencia, conocimiento, motivación y paciencia nos orientaron durante todo el proceso de investigación.

Melissa

Agradezco en primer lugar a Dios por estar siempre a mi lado, cuidarme y darme la salud y sabiduría necesaria para conseguir mis metas. A mis padres Dolores y Marcos que son un pilar fundamental en mi vida por brindarme su amor, comprensión y apoyo incondicional, por enseñarme a trabajar para conseguir mis sueños. A mis hermanos Marco e Ismael por acompañarme y alentarme a seguir en este trayecto tan importante, por las noches de compañía en los momentos de estudio. A mi esposo Jairo por el apoyo, el amor y las risas, por tenderme la mano cuando más lo necesitaba. A mis amigas que han sido una ayuda idónea para cumplir esta meta, en especial a Gaby por todos los momentos compartidos. Gracias a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por darme la oportunidad de llegar a ser una profesional, a la ingeniera Paola Arguello por todo el apoyo prestado en la realización de este trabajo de titulación y en los años de estudio, por ser una excelente persona y docente, que ayuda tanto en la formación académica como personal, igualmente gracias a la Doctora Ana Albuja por ser una gran profesional y ser humano.

Priscila

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN.....	x
SUMMARY	xi
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	4
1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).....	4
1.1.1. Tipos de ETAs.....	5
1.1.2. <i>Causas</i>	5
1.1.3. <i>Prácticas correctas de higiene</i>	6
1.2 Leche	6
1.2.1 <i>Leche cruda</i>	7
1.2.2 <i>Composición química de la leche cruda</i>	7
1.2.3. <i>Valor nutricional</i>	7
1.2.4. <i>Contaminantes de la leche cruda</i>	8
1.3 Calidad de leche cruda	10
1.3.1. <i>Calidad fisicoquímica</i>	10
1.3.2. <i>Calidad microbiológica</i>	13
1.4 Métodos de aislamiento e identificación.....	14
1.5 Centros de Acopio	15

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	16
2.1. Localización del estudio.....	16

2.2. Población de estudio.....	16
2.3. Tamaño de la muestra	16
2.4. Equipos, materiales y reactivos.....	16
2.4.1. Análisis Físicoquímico.....	16
2.4.2. Análisis Microbiológico	17
2.5. Técnicas y Métodos	18
2.5.1. Muestreo	18
2.5.2. Análisis Físicoquímico.....	19
2.5.3. Análisis microbiológico.....	21

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS.....	27
3.2. Lista de chequeo: Requisitos para centros de acopio de leche cruda	27
3.3. Lista de chequeo: Requisitos de medios de transporte de leche cruda.....	31
3.2.1. Requisitos de medios de transporte de leche cruda: tanquero.....	32
3.2.2. Resultado de la lista de chequeo: Proveedores.....	33
3.4. Análisis físicoquímicos	37
3.5. Análisis microbiológico	40
<input type="checkbox"/> Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	42
<input type="checkbox"/> Recuento de Enterobacterias	43
<input type="checkbox"/> Recuento de Aerobios mesófilos	44
<input type="checkbox"/> Recuento de Mohos y Levaduras.....	44
<input type="checkbox"/> Bacterias Ácido lácticas.....	45
3.6. Identificación de microorganismos.....	45
CONCLUSIONES.....	48
RECOMENDACIONES.....	49

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Composición química de la leche	7
Tabla 1-2:	Número de muestras para el análisis microbiológico.....	19
Tabla 1-3:	Resultados de la lista de chequeo: Requisitos para centros de acopio de leche cruda	28
Tabla 2-3:	Porcentaje deCumplimiento y no cumplimiento de los centros de acopio.....	31
Tabla 3-3:	Resultados de la lista de chequeo aplicada al tanquero.....	32
Tabla 4-3:	Resultados de la lista de chequeo aplicado a los proveedores.....	34
Tabla 5-3:	Resultados de los análisis fisicoquímicos de la leche cruda.....	38
Tabla 6-3:	Resultados del análisis microbiológico de la leche cruda de cada centro de acopio en Log 10 UFC/g.....	41
Tabla 7-3:	Resultados de las pruebas bioquímicas.....	46

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1: Tipos de enfermedades transmitidas por alimentos.....	5
Gráfico 2-1: Fuentes de contaminantes químicos que afectan al bovino.....	9
Gráfico 1-2: Interpretación visual de las tirillas de antibiótico.....	21
Gráfico 1-3: Entrega de leche a través de bidones o botellas de plástico.....	36

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: FLUJOGRAMA DEL PROCESO DE DISPOSICIÓN DE LA LECHE CRUDA EN
LOS CENTROS DE ACOPIO

ANEXO B: DIAGRAMA DE FLUJO DEL CENTRO DE ACOPIO Y ENFRIAMIENTO DE
LECHE

ANEXO C:EVIDENCIAS FOTOGRÁFICAS

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche cruda almacenada en tres centros de acopio (CA) ubicados en el Cantón Guano, provincia de Chimborazo. Se utilizó una lista de chequeo de las condiciones higiénicas sanitarias emitida por Agrocalidad aplicada a los centros de acopio, al transporte que entrega la leche y al que lleva el producto a la Industria Láctea. Se tomaron muestras de leche por duplicado del tanque de almacenamiento en cada CA durante tres días para realizar los análisis fisicoquímicos mediante el equipo LACTOSCAN y pruebas rápidas. Se realizó el recuento de microorganismos indicadores de la calidad sanitaria: Enterobacterias, *Staphylococcus aureus*, aerobios mesófilos, mohos y levaduras, y el recuento de bacterias ácido-lácticas utilizando las normas técnicas ecuatorianas pertinentes. Se identificó el género y especie de bacterias aisladas de cultivos de Enterobacterias a través tinción Gram y pruebas bioquímicas. Los resultados muestran que la calidad de la leche se ve afectada por la falta de infraestructura e higiene en los CA, y por el bajo nivel de cumplimiento del transporte que entrega la leche al centro. Los resultados en cuanto al análisis fisicoquímico mostraron que pH y punto crioscópico se encontraban fuera de los límites permisibles. Los resultados del recuento de Enterobacterias, aeróbios mesófilos, mohos y levaduras y *Staphylococcus aureus*, superaron los valores en $\log_{10} \text{UFC/g}$ 5,11; 6,18; 4,48; 3 a 4, respectivamente. El género y especie de Enterobacterias identificadas fueron *Escherichia coli* inactiva y *Klebsiella pneumoniae*. En conclusión, la leche cruda presenta baja calidad microbiológica atribuyéndose a inadecuadas condiciones de manipulación. Se recomienda más investigación del estado de salud de los animales, especialmente lo relacionado a la mastitis y la importancia del efecto de los contenedores para determinar su contribución a la calidad microbiana.

Palabras clave: <LECHE CRUDA>, <ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAS)>, <CALIDAD HIGIENICO - SANITARIA>, <ANÁLISIS FISICOQUÍMICO>, <ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO>, <CENTROS DE ACOPIO>, <MICROORGANISMOS>.



SUMMARY

The objective of this research work was to evaluate the physicochemical and microbiological quality of raw milk stored in three collection centers (CC) located in Guano Canton, province of Chimborazo. A checklist of the sanitary hygienic conditions issued by Agrocalidad applied to the collection centers, the transport that delivers the milk and the one that takes the product to the Dairy Industry was used. Duplicate milk samples were taken from the storage tank in each CC for three days to perform the physicochemical analyzes using the LACTOSCAN equipment and rapid tests. The count of health quality indicator microorganisms was carried out: Enterobacteria, *Staphylococcus aureus*, mesophilic aerobes, molds and yeasts, and the lactic acid bacteria count using the relevant Ecuadorian technical standards. The genus and species of bacteria isolated from Enterobacteria cultures were identified through Gram staining and biochemical tests. The results show that milk quality is affected by the lack of infrastructure and hygiene in the CAs, and by the low level of compliance with the transport delivered by the milk to the center. The results regarding the physicochemical analysis showed that pH and cryoscopic point were outside the permissible limits. The results of the count of Enterobacterias, mesophilic aerobes, mold and yeast and *Staphylococcus aureus*, exceeded the values in log 10UF/g 5.11; 6.18, 4.48; 3 to 4, respectively. The genus and species identified Enterobacteria were inactive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. In conclusion, raw milk has low microbiological quality, attributed to inadequate handling conditions. More research on the health status of animals is recommended, especially related to mastitis and the importance of the effect of containers to determine their contribution to microbial quality.

Keywords:<RAW MILK>, <FOOD TRANSMITTED DISEASES (FTD)>, <HYGIENIC - SANITARY QUALITY>, <PHYSICAL-CHEMICAL ANALYSIS>, <MICROBIOLOGICAL ANALYSIS>, <COOP CENTERS>, <MICROORGANISMS>.



INTRODUCCIÓN

La leche es un alimento que no puede faltar en la canasta básica ecuatoriana, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. El consumo de leche y derivados lácteos es de 181 mL al día por persona, lo que varía en dependencia de la edad, sin embargo, a medida que avanza el tiempo, su consumo se ha visto afectado, ya que se considera uno de los principales alimentos vectores en la transmisión de las ETAs (Freire et al., 2012, p. 7-11).

En Ecuador, alrededor de 82 millones de dólares fueron destinados para el tratamiento de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), según afirmó Rommel Betancourt, Coordinador General de Inocuidad de Alimentos y Agrocalidad, y cada vez van en aumento, porque que no existe un control riguroso de su calidad por parte de las autoridades competentes (Coello, 2018, p. 12).

De acuerdo a la declaración del Gerente General de la Asociación de Ganaderos de la Sierra y Oriente, el 75% de la producción lechera en el país se encuentra en la Sierra, siendo Pichincha, Azuay, Tungurahua, Carchi y Chimborazo las provincias con mayor producción de leche a nivel Nacional, las mismas que cuentan con centros de acopio y enfriamiento de leche cruda, implementados con el fin de ayudar a los pequeños productores de las zonas en donde se encuentran establecidos (Centro de la Industria Láctea, 2015, p. 20).

La calidad de la leche cruda y la de sus derivados dependen directamente de las zonas de producción; así como de las condiciones de ordeño, transporte, conservación y manipulación. Debido a su alta demanda, es importante que durante su proceso de obtención hasta su comercialización se apliquen medidas higiénicas adecuadas para ofrecer un producto apto para el consumo humano y por ende evitar las ETAs (Centro de la Industria Láctea, 2015, p. 25).

Sin embargo, pese a que existen guías que permiten aplicar métodos modernos e higiénicos que garanticen su calidad, no todos los productores lo ponen en práctica debido a la falta de información y capacitación en las buenas prácticas de ordeño, manipulación, almacenamiento, transporte y distribución, poca cultura en prácticas de higiene, deficiencia en estructura y maquinaria y escasos recursos económicos (Fienco, 2013, pp. 5 -7).

Por tal motivo, es necesario realizar un control de la leche desde el ordeño hasta que el producto se comercializa, lo que generalmente se realiza de forma directa o como materia prima para los derivados lácteos y si es manipulada de manera inadecuada, representan un alto riesgo tanto

para la salud de los consumidores como en la industria que utilizará materia prima de baja calidad, obteniendo productos de calidad inadecuada. (Fienco, 2013, pp. 5 -7)

Por ello, se plantea una investigación sobre la calidad de la leche cruda recibida en los centros de acopio mediante análisis fisicoquímicos y microbiológicos en tres centros de acopio de leche cruda, ubicados en el Cantón Guano, Provincia de Chimborazo; los mismos que proveen de leche a una Industria Láctea.

Este trabajo es parte del proyecto de investigación “Estudio de la calidad fisicoquímica y biodiversidad microbiana, en la cadena de producción artesanal de quesos elaborados en la zona 3 del país y comercializados en mercados populares de la provincia del Guayas” del grupo de investigación SAGID de la ESPOCH, para esto se cuenta con la aprobación de la administración de dichos centros y con laboratorios implementados con equipos y reactivos que permitirán desarrollar los mencionados análisis.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

- Evaluar la calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche cruda almacenada en centros de acopio de la provincia de Chimborazo.

Objetivos específicos

- Valorar las condiciones higiénico – sanitarias de los medios de transporte y centros de acopio de leche cruda utilizando la lista de chequeo emitida por Agrocalidad con el fin de determinar potenciales fuentes de contaminación.
- Evaluar la calidad fisicoquímica de muestras de leche cruda de tres centros de acopio mediante un analizador de composición por ultrasonido
- Determinar en la leche cruda, los niveles de microorganismos indicadores de la calidad sanitaria evaluando su calidad microbiológica.
- Caracterizar e identificar enterobacterias usando pruebas bioquímicas convencionales.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son trastornos del tracto intestinal que causan diarrea, vómito y dolores abdominales, entre otros síntomas como mareos, visión borrosa y dolor de cabeza de carácter infeccioso o tóxico; causadas principalmente por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que ingresan en el organismo a través del agua o alimentos contaminados (Torrens et al., 2015, pp. 3-8).

Estas enfermedades son causadas por la ingestión de alimentos que contienen cantidades considerables de bacterias infecciosas y a su vez que resultan ser nocivas o dañinas para el organismo; así como también de productos tóxicos (venenos o sustancias químicas) que se producen por la proliferación y desarrollo de éstas en el organismo humano (Torrens et al., 2015, pp. 3-8).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son un problema que debe ser tomado en cuenta en el ámbito de carácter social, económico, tecnológico, político y cultural. Esta complicación es prevalente en los países subdesarrollados o en vías de desarrollo, principalmente debido a un déficit de los sistemas higiénico sanitarios, las autoridades e instancias gubernamentales y otras instituciones afines que no están organizadas, tanto del sector público como privado, las mismas que deberían realizar campañas de vigilancia continua, con la finalidad de prevenir o corregir escenarios que pueden ser peligrosos y que pueden afectar la salud de la población en general (Kopper et al., 2009, pp. 16 -18).

Los casos de enfermedades transmitidas por los alimentos, ya sean intoxicaciones, infecciones bacterianas o parasitarias, o una combinación de las mismas (infecto-intoxicación), son bastante frecuentes y afligen sobre todo a grupos sociales económicamente pobres o de bajos recursos. La mayoría de veces tienen acceso a alimentos de bajo costo, de calidad e inocuidad deficiente o de dudosa procedencia que pone en peligro directo su salud (Rodríguez et al., 2015, p. 4).

1.1.1. Tipos de ETAs

La leche por ser un alimento rico en proteínas, minerales, vitaminas y grasas, es un medio ideal para el crecimiento de microorganismos, que dará lugar a un riesgo potencial para la salud de los consumidores.

Así mismo la leche o cualquier otro derivado lácteo puede ser un vehículo de enfermedades (microorganismos) que pueden afectar a las personas quienes lo consuman, por lo que es de vital importancia los controles de calidad necesarios en los procesos de la industrialización (manufactura, embalaje, transporte y comercialización) que parten en la granja y culminan en el consumidor final (Zúñiga y Lozano, 2017, p. 96).

Dentro de los tipos de enfermedades transmitidas por alimentos se encuentran las infecciones, intoxicaciones, toxoinfecciones e infestaciones, cuyas causas se muestran en el Gráfico 1.

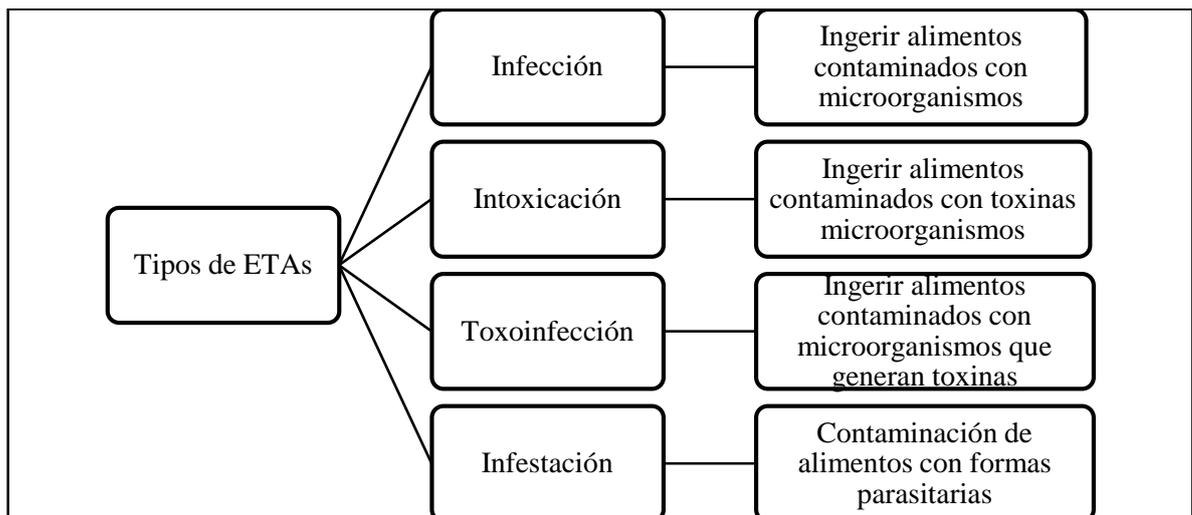


Gráfico 1-1: Tipos de Enfermedades Transmitidas por Alimentos

Realizado por: Ramírez, Melissa, 2019

1.1.2. Causas

Las ETAs pueden darse por varias causas, las cuales se encuentran categorizadas en tres grupos principalmente:

A. Riesgos biológicos: son considerados una gran amenaza para la seguridad de los alimentos. En este grupo se encuentran microorganismos como: parásitos, bacterias y virus, dentro de los cuales los dos últimos presentan mayor porcentaje de prevalencia en la aparición de ETAs. Este riesgo puede ser propio de algunos alimentos, pero también puede deberse a una incorrecta manipulación de los mismos (Departamento De Salud De Minesota, 2016).

- B. Riesgos químicos en esta categoría se habla de contaminantes químicos y toxinas naturales. Cabe recalcar que algunos alimentos generan toxinas naturales de manera inherente, pero en ocasiones los microorganismos patógenos generan toxinas al abusar del tiempo de conservación o de la temperatura. También existen varios aditivos que pueden ser peligrosos para determinadas personas. Por otro lado, la contaminación con químicos puede ocurrir cuando estos productos no son usados correctamente por los manipuladores de la limpieza (Rodríguez et al., 2015, p. 8).
- C. Riesgos Físicos: estos generalmente tienen que ver con la contaminación con virutas de metal, piezas de plástico o vidrios rotos (ANMAT, 2017, p.1).

1.1.3. Prácticas correctas de higiene

Según la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA, 2018), las prácticas correctas de higiene (PCH) son la “Aplicación de todas las condiciones y medidas necesarias para asegurar la inocuidad y la aptitud de los alimentos en todas las fases de la cadena alimentaria”. Estas se encuentran descritas en el Manual de Prácticas Correctas de Higiene y Manipulación de alimentos, que involucra temas como: adecuadas condiciones higiénicas del espacio de trabajo, limpieza de utensilios, correcta manipulación de alimentos, contaminación cruzada, indumentaria del personal, entre otros, cuyo fin es el fortalecer los conocimientos en manipulación de alimentos para precautelar la salud.

Aplica a los establecimientos procesadores de alimentos categorizados como artesanales y Organizaciones del Sistema de Economía Popular y Solidaria. Las PCH reemplazan a las BPM solo para los establecimientos procesadores de alimentos categorizados como artesanales y Organizaciones del Sistema de Economía Popular y Solidaria. Estas prácticas no son obligatorias, son opcionales por el momento, pero serán obligatorias en un lapso previamente determinado (Control sanitario, 2015, p. 5-10).

1.2 Leche

La leche es un 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 (CODEX STAN 206, 1999, p. 2).

1.2.1 Leche cruda

Según la NTE INEN 9, la leche cruda es un alimento que no ha sido sometido a ningún tipo de proceso térmico por encima de los 40°C inmediatamente después de ser extraída de la ubre. Mientras que la FDA la define como aquella que proviene de ovejas, cabras o vacas, la misma que no ha pasado por un proceso de pasteurización para matar las bacterias patógenas(FDA, 2012, p. 2)

1.2.2 Composición química de la leche cruda

La composición química de la leche cruda varía en función de la alimentación, raza, edad, periodo de lactancia, época del año y sistema de ordeño de la vaca, entre otros factores.

Los principales componentes de la leche se describen en la Tabla 1 y cabe recalcar que su principal componente es el agua. Además, los componentes pueden variar de acuerdo a los factores ya mencionados.

Tabla 1-1: Composición química de la leche

COMPONENTES	PORCENTAJE
Agua	85,3 - 88,7%
Lactosa	3,8 - 5,3%
Grasa	2,5 a 5,5%
Proteínas	2,3 - 4,4 %
Minerales	0.8%
Vitaminas	0.2%
Enzimas	0.1%

Fuente:Wingching y Mora, 2013

Realizado: Ramírez, Melissa, 2019

1.2.3. Valor nutricional

La leche y los productos lácteos constituyen un grupo de alimentos que son considerados completos, debido a que proporcionan un elevado grupo de nutrientes. Presenta una composición muy equilibrada, aportando proteínas de alto valor biológico, grasa, hidratos de carbono, vitaminas liposolubles y minerales de los que destacan el calcio y fósforo(Fernández et al., 2015, pp. 93 - 96).

La leche aporta proteínas de alto valor biológico; las mismas que son contenidas en dos fracciones. Las caseínas (α s1, α s2, β - y κ -caseína) constituyen el 80% y son de absorción lenta, y las proteínas séricas (albúmina y globulina) constituyen el 20% y son de absorción rápida.

Además, proporciona aminoácidos esenciales que cubren los requerimientos humanos como la leucina, isoleucina, valina y especialmente la lisina(Fernández et al., 2015, pp. 93 - 96).

La lactosa es el principal carbohidrato de la leche, tiene un efecto beneficioso en la absorción de calcio. Es hidrolizada, por la enzima lactasa, en dos azúcares simples: la glucosa y galactosa, que el cuerpo utiliza como fuente de energía. Cuando existe una deficiencia de esta enzima, es decir no se produce la cantidad suficiente en el intestino delgado provoca lo que se conoce como intolerancia a la lactosa (Fernández et al., 2015, pp. 93 - 96).

La leche, además contiene una gran cantidad de grasa (100mL de leche aportan 3,6g de grasa), vitaminas hidrosolubles y liposolubles (Vitamina B1, B2, B3, B6, B12, A, D, E), minerales principalmente como el calcio y fósforo que ayudan a mantener huesos y dientes sanos. En menor proporción se encuentra el potasio, cinc y yodo que junto con los otros minerales ayudan al correcto funcionamiento del organismo(Fernández et al., 2015, pp. 93 - 96).

1.2.4. Contaminantes de la leche cruda

La contaminación de la leche puede ocurrir desde el ordeño hasta su comercialización. Los principales agentes contaminantes son los químicos y los biológicos.

1.2.4.1. Contaminantes químicos

Los contaminantes de tipo químico pueden darse desde el ordeño hasta su comercialización; aunque también provienen de los medicamentos veterinarios, sustancias que se utilizan en la cría de los animales, productos que el animal ingiere como los pastos que pueden contener residuos de insecticidas, plaguicidas y restos de detergentes o desinfectantes utilizados en la limpieza de equipos. Los contaminantes químicos pueden llegar al bovino y excretarse en la leche, tal y como se presenta en el Gráfico 2.

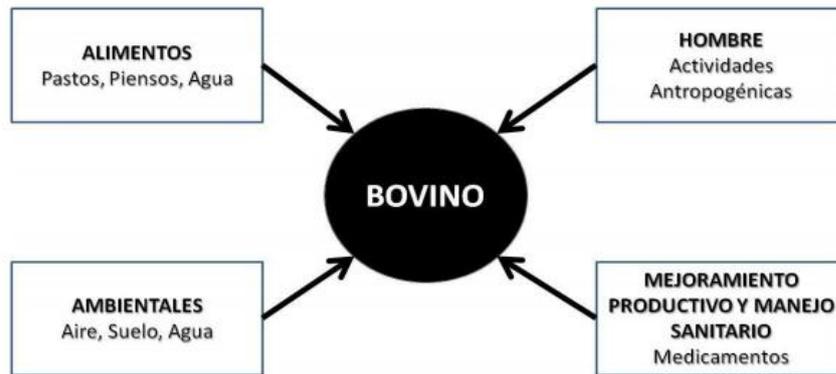


Gráfico 2-1: Fuentes de contaminantes químicos que afectan al bovino

Fuente: (Instituto Nacional de Salud, 2010, p.17)

Medicamentos veterinarios: se definen como sustancias que se aplican o administran a cualquier animal destinado a la producción de alimentos, tanto con fines terapéuticos como profilácticos o de diagnóstico, o bien para modificar las funciones fisiológicas o el comportamiento (Instituto Nacional de Salud, 2010, p.17). En nuestro país, estos medicamentos se encuentran bajo la vigilancia de Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario.

Dentro de los medicamentos veterinarios tenemos antimicrobianos, antiparasitarios, antiinflamatorios, entre otros; los mismos que generan productos de baja calidad y constituyen un riesgo para la salud de los consumidores, produciendo toxicidad ya sea aguda o crónica, efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas y fenómenos de resistencia bacteriana, entre otros (Lozano y Arias, 2008, pp.128-135).

Plaguicida: se define como cualquier sustancia destinada a destruir o combatir cualquier plaga o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. Los residuos plaguicidas son sustancias que se encuentran presentes en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales (FAO/OMS, 2013). Los plaguicidas son potencialmente tóxicos para los seres humanos, llegando a causar problemas graves de salud como provocar cáncer o causar daño en los sistemas reproductivo, inmunitario o nervioso (FAO, 2017, pp. 77 - 80).

1.2.4.2. Contaminantes biológicos

Los contaminantes biológicos son, con mucho, la mayor causa de enfermedad. Muchos de los riesgos asociados con los contaminantes biológicos pueden controlarse o eliminarse mediante prácticas efectivas de manipulación de alimentos, por lo que es fundamental que se sigan los procedimientos de prevención y manipulación de alimentos seguros. Los microbios están a nuestro alrededor. Son seres vivos, a menudo demasiado pequeños para ser vistos sin un

microscopio. Muchos microbios son beneficiosos, pero algunos pueden causar enfermedades o incluso la muerte. Estos microbios dañinos se llaman patógenos. Cinco tipos de microbios incluyen bacterias, virus, parásitos, protozoos y hongos. El número de microorganismos en leche se encuentra limitada por las normas de cada país(BCCAMPUS OPEN EDUCATION, 2018)

1.3 Calidad de leche cruda

El proceso de producción de leche resulta complejo debido a que su calidad se puede ver comprometida por su valor nutricional, resultando más susceptible el ataque de microorganismos, así como de contaminantes químicos que tienen el fin de alterar la composición del producto para no vulnerar normas específicas sobre la composición de la leche (adición de bases para ocultar la acidez). Las condiciones del proceso tecnológico de obtención, composición química y microbiológica y las condiciones higiénicas deben acatar los requisitos establecidos por las normativas, en el caso de que no se cumplan pueden dar lugar a brotes de ETAs. Existe una serie de indicadores (físicoquímicos, microbiológicos, organolépticos, higiénico-sanitarios) que permite determinar la calidad de la leche (Martínez et al., 2017, p. 55).

1.3.1. Calidad fisicoquímica

1.3.1.1 Indicadores Fisicoquímicos

Los diversos análisis de laboratorio ayudan a establecer las características fisicoquímicas de la leche. La densidad varía entre 1,028 a 1,034 g/L. El punto de congelación resulta ser una de las características más estables cuyo rango varía, de -0,513 a -0,565 °C, en dependencia del contenido de proteínas, sales minerales y lactosa; cuando este valor se acerca a 0°C permite detectar la adición de agua. La presencia de diversos componentes y el conocimiento de las cantidades expresan la calidad de la leche. Ensayos que permiten determinar el contenido de proteínas, lactosa, grasa, sólidos totales y sólidos no grasos se usa para la valoración total de la composición de la leche para mejora de la calidad (Martínez et al., 2017, p. 54).

1.3.1.2 Pruebas de laboratorio

En el laboratorio se desarrolla diversas pruebas para conocer la composición de la leche. Previo a los ensayos se realiza un análisis sensorial de la muestra en los cuales se tiene en cuenta los factores de apariencia, textura y olor, tras ello se llevan a cabo ensayos físicos y químicos.(Arguello, 2017, p. 5)

A. Pruebas Físicas

pH: los valores de pH normales de la leche se encuentran en un rango de 6,5 a 6,7 cuya variación puede deberse a la presencia de microorganismos y compuestos químicos básicos. Su determinación puede realizarse por métodos colorimétricos empleando indicadores, pero se recomienda los métodos electrométricos (Universidad del Zulia, 2003, p. 13)

Densidad: se define como la relación entre la densidad del agua destilada y la densidad de la muestra, ambas a una temperatura determinada. Puede determinarse mediante el método del lactodensímetro o el método del picnómetro. (Arguello, 2017, p. 4).

Índice de refracción: esta característica mide el cambio de dirección de un rayo de luz al pasar de un medio a otro, por ejemplo, aire y leche. Es propia de cada sustancia manteniéndose en la mayoría de los casos constante en condiciones específicas de temperatura y longitud de onda de la luz (Vargas, 2004, p 18).

Punto de congelación: para la determinación del punto de congelación se emplea un crioscopio estandarizado que deberá contar con las características que se encuentran en la norma INEN 15 y en la cual se menciona el procedimiento adecuado para la determinación (NTE INEN 15, 1973)

B. Pruebas Químicas

Determinación de grasa: la grasa de la leche es definida como el total de materia grasa y sustancias lipoides (Universidad del Zulia, 2003, p. 6). Es sintetizada mayoritariamente en las células secretoras de la glándula mamaria constituyendo el 3% de la leche, se observa en forma de partículas emulsionadas y suspendidas en pequeños glóbulos microscópicos. El contenido de grasa puede variar en dependencia de la raza y alimentación; en los diferentes periodos de la lactancia se mantiene constante, puede disminuir su porcentaje en el calostro (Buñay y Peralta, 2015, p. 23).

Determinación de la estabilidad proteica: la estabilidad proteica es la propiedad que tiene la leche de no generar una coagulación o precipitación de la proteína, en contacto con una solución de alcohol etílico o de una solución alcohólica de alizarina o por acción del calor, cuya causa es la acidificación (Arguello, 2017, p.7).

Acidez titulable: corresponde a la acidez de la leche, se expresa como contenido de ácido láctico, cuya determinación se realiza mediante procedimientos normalizados (Arguello, 2017, p. 7). El valor normal varía de 13 a 20 mL NaOH, se debe a la cantidad de proteínas, anhídrido carbónico y aniones como el citrato y fosfato (Universidad del Zulia, 2003, p. 11).

Ensayo de Reductasa: los microorganismos presentes en la leche pueden producir enzimas reductasas que tienen la capacidad de modificar el potencial óxido-reducción de la leche. Lo que se demuestra al añadir una sustancia, generalmente azul de metileno, que se decolora al pasar de la forma oxidada a la forma reducida. La cantidad de población bacteriana está directamente relacionada con la rapidez de cambio de color de la sustancia (García et al, 2014, p 3).

Determinación de Sólidos Totales: los sólidos totales son el resultado de la desecación de la leche, varía del 10 al 15 %, está formado principalmente por grasa, proteína, lactosa y minerales. Se realiza por métodos gravimétricos, que se fundamenta en la evaporación del agua, y por métodos volumétricos que determina el agua presente en la muestra por destilación y posterior medición del agua destilada en un tubo colector graduado (Universidad del Zulia, 2004, p .9).

Determinación de sólidos no grasos: los sólidos no grasos están compuestos por lactosa, sales minerales (fósforo, calcio, hierro) y proteínas (caseína), son necesarios para la textura firme y cuerpo esponjoso y cremoso de la leche. Un método muy empleado para la determinación de sólidos no grasos es el método lactométrico (Universidad del Zulia, 2003, p 9).

Cenizas: las cenizas son los residuos inorgánicos que queda tras calcinar la muestra, se termina por el método de calcinación en mufla. Generalmente las cenizas no son las mismas sustancias inorgánicas que se encuentran en el alimento original puesto que ocurren interacciones químicas y pérdidas debido a la volatilización por el calor (Universidad del Zulia, 2003, p 9).

Determinación de Proteínas: las proteínas son un componente muy importante de la leche pues permite la nutrición del becerro, su determinación se realiza mediante el método Kjeldahl, en el cual se lleva a cabo una digestión de las proteínas y otros componentes orgánicos de los alimentos, el nitrógeno orgánico total se convierte en sulfato de amonio. Lo que se obtuvo de la digestión se neutraliza con una base y posteriormente se destila. El destilado se recoge en una solución de ácido bórico. Los aniones de borato formados se titulan con HCl o H₂SO₄ para determinar el nitrógeno contenido en la muestra (Santiago, 2011).

1.3.2. Calidad microbiológica

La calidad de la leche depende principalmente de la concentración en componentes, y un bajo número de microorganismos. Por ello, la leche destinada para el consumo humano debe estar libre de microorganismos patógenos, sedimentos y compuestos extraños o dañinos entre otras. Un recuento bacteriano alto se asocia con la falta de condiciones higiénico-sanitarias en el proceso de obtención de la leche lo que puede dar lugar a pérdidas de producción lechera y disminución del volumen, además de los riesgos de contraer ETAs por los consumidores (Mariscalet al, 2013, p. 19)

1.3.2.1. Microorganismos indicadores

Escherichia coli: es un microorganismo muy común en el laboratorio, participante de enfermedades infecciosas que actúan sobre tejidos y órganos. Producen toxinas que inducen shock. “Es una bacteria bacilo Gram negativa, anaerobia facultativa, mide 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo, no forman esporas; se movilizan mediante flagelos peritricos, son catalasas positivas y oxidasa negativos; no son exigentes nutricionalmente, crecen a pH 6 - 7 a temperatura de 37°C, son fermentadoras de glucosa, fructosa y sacarosa, forman indol y sulfuro de hidrógeno; su medio de cultivo es el Agar EMB forma colonias de 2 a 4mm de diámetro, con un centro grande de color oscuro que al ser reflejados por la luz se observan de color verde metálico. Es capaz de desarrollarse en las siguientes pruebas: TSI, SIM, RM, CITRATO SIMMON, MIL, UREA, Agar EMB, VRB” (Espinoza, 2015, p. 35).

Salmonella: Este microorganismo es capaz de producir zoonosis, se transmite por contaminación cruda, contacto directo o por vía sexual. “Son bacilos cortos de 1-2 μ m, Gram negativos, están envueltas por varias capas: la membrana externa, la pared celular, y la membrana interna. Crecen a 38°C con facilidad en agar sangre, formando colonias de 2 a 3 milímetros. Es el agente causal de diferentes infecciones intestinales, conocidas como salmonelosis, una vez multiplicado sufre lisis y libera endotoxinas que son responsables de los síntomas clínicos. El periodo de incubación es de 12 y 36 horas, los principales síntomas son: dolor abdominal, náuseas, fiebre, diarrea, somnolencia, deshidratación, las heces son acuosas, color verdoso y a veces teñidas de sangre” (Espinoza, 2015, p. 51-42).

Staphylococcus aureus: son cocos Gram positivos de la familia Staphylococcaceae. En la industria alimentaria este germen muestra contaminación a partir de los manipuladores, de la materia prima, además del escaso proceso de limpieza y desinfección de materiales (Pilamunga,

2017, p. 27). Este microorganismo se ha convertido en el causante de intoxicaciones por los alimentos y de infecciones en el torrente circulatorio e intoxicaciones ocasionadas por alimentos. Los medios para aislar esta bacteria son Baird-Parker, agar salado manitol, agar estafilococos N° 110, agar DNAsa (Zendejas et al, 2014, p. 135).

Enterobacterias: son bacilos Gram negativos, aerobios facultativos y móviles, fermentadores de lactosa. Actualmente es considerado patógeno oportunista emergente con alto riesgo en salud pública en todo el mundo, causando meningitis y enterocolitis necrosante, principalmente en neonatos e infantes de riesgo, con una mortalidad entre 20% y 50%; asimismo, puede generar secuelas de tipo neurológico. Para su identificación se usan medios como agar VRBA (Oxoid), agar tripticosa de soya (TSA, Oxoid) y con los kits comerciales Crystal (BBL) y Oxidasa (Merck) (Vanegas et al, 2009, p. 38).

1.4 Métodos de aislamiento e identificación

Las técnicas más comúnmente utilizadas, tanto en dependencia del costo como de su larga historia, son las pruebas bioquímicas. Las pruebas bioquímicas investigan las actividades enzimáticas de las células que sirven como pruebas potentes en la identificación de bacterias. La base de muchas pruebas bioquímicas es el hecho de que las bacterias son capaces de utilizar diferentes fuentes de carbono para obtener la energía que necesitan para vivir. Conocer qué fuentes de carbono reaccionan y cuáles no permiten realizar una evaluación probabilística (Sandle 2016, p.109).

Las pruebas bioquímicas preliminares son catalasa, coagulasa y oxidasa, otras pruebas cuya lectura se realiza tras 18 -24 horas de incubación son: óxido-fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, Voges-Proskauer, Agar hierro de Kligler, fermentación de azúcares, hidrólisis de la esculina, coagulasa, fenilalanina-desaminasa, DNasa, hidrólisis de la gelatina, decarboxilasas, lipasa, lecitinasa, utilización de citratos, utilización de malonato, y prueba de CAMP entre las más frecuentes. Estos últimos medios se realizan en tubos en dependencia del cambio de color o de la reacción, los resultados se consideraban positivos o negativos. Estos resultados permiten determinar que bacteria se encontraba en la muestra ya que cada uno tiene sus características en cuando a su metabolismo.

Un ejemplo de perfil bioquímico es el sistema de identificación API o el sistema alternativo de cristal BBL (microtubos que contienen sustratos deshidratados). Las API fueron las primeras pruebas de identificación de este tipo y fue inventada a principios de la década de 1970 por Pierre Janin de Analytab Products (Sandle, 2016, p.109). Estas pruebas están formadas por pocillos aislados los cuales contienen sustratos liofilizados en los que se inocula de forma individual la

muestra, este tipo de pruebas permite realizar entre 10 y 50 pruebas bioquímicas de forma simultánea. Estas pruebas expresan números como resultados, agrupados de tres en tres, dando como resultado un único dígito. Cada especie tiene asignada un código numérico, que concuerda con los resultados de la codificación tras obtener los resultados de las pruebas (Bou et al 2011, p. 602).

1.5 Centros de Acopio

Los centros de acopio son establecimientos en los cuales se receipta y almacena la producción de varios proveedores de leche. Están conformados por equipos y materiales que permiten mantener una temperatura (2° a 4°C) adecuada para garantizar la inocuidad de la leche cruda; del mismo modo, el establecimiento debe contar con áreas destinadas a la recepción, enfriamiento, análisis y entrega, estas áreas no pueden ser utilizadas en el desarrollo de actividades ajenas para las que en un principio fueron creadas (Agrocalidad, 2013, pp. 5-10).

Estos centros deben cumplir con los siguientes requerimientos mínimos:

- Sistema de recepción y pesaje: como puede ser báscula, tanques de recepción y equipo de filtración con el fin de desechar los sólidos indeseables que contenga la leche.
- Maquinaria y equipo de enfriamiento: tina de balance, tanque silo para almacenamiento de producto con refrigeración integrada y agitador de tanque silo.
- Maquinaria y equipo del sistema de circulación: calentador, bomba de envío de leche al tanque silo, bomba de carga de pipas, tubería de llenado y tubería de retorno.
- Sistemas anexos: subestación eléctrica y controles (Sedesol, 2011, p. 17)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Localización del estudio

El estudio se llevó a cabo en tres centros de acopio ubicados en el cantón Guano, provincia de Chimborazo, los mismos que proveen de leche cruda a una Industria Procesadora.

Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos se llevaron a cabo en los Laboratorios de Bromatología y Microbiología, respectivamente, de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ubicada en la Panamericana Sur km 1 1/2, Riobamba – Ecuador.

2.2. Población de estudio

La población está conformada por los centros de Acopio del cantón Guano, provincia de Chimborazo.

2.3. Tamaño de la muestra

En este estudio la muestra se corresponde a la población, ya que se evaluarán las condiciones higiénico-sanitarias de los tres centros de acopio, y se tomarán muestras representativas de cada tanque de almacenamiento de leche en la cantidad necesaria para realizar los análisis pertinentes (aproximadamente 1 litro por tanque).

2.4. Equipos, materiales y reactivos

2.4.1. Análisis Fisicoquímico

A. Equipos

Sorbona

Lactoscan

Balanza analítica

B. Materiales

Balón de aforo 100mL

Pipetas 10 mL

Pera de succión

Guantes

Mascarillas

Gorros

Mandil

C. Reactivos

Solución roja

Solución azul

Agua destilada

2.4.2. Análisis Microbiológico

A. Equipos

Autoclave

Cámara de flujo laminar

Incubadora bacteriana

pH-metro

Balanza Analítica

B. Materiales

Reverbero

Vaso de precipitación 250mL

Erlenmeyer 50mL

Probeta 50mL

Pipetas 10mL

Cajas Petri de vidrio

Pera de succión

Asa de drigalsky

Gradilla

Tubos

Varilla de agitación

Pipetas automáticas

Puntas de plástico

Algodón

Gasas

Papel aluminio

Guantes

Mascarillas

Gorros

Mandil

C. Reactivos

Lugol

Safranina

Cristal violeta

Acetona

Aceite de inmersión

Medio de cultivo MRS caldo

Medio de cultivo M17 caldo

Medio de cultivo MacConkey Agar

Medio de cultivo EMB Agar

Medio de cultivo Baird-Parker Agar

Medio de cultivo Sabouraud Agar

Medio de cultivo PCA Agar

Medio de cultivo Bacto Agar

Medio de cultivo Soya Trypticase Agar

Manitol Salado Agar

Kligler Hierro Agar

Simmons Citrato Agar

Medio SIM

Urea Agar Base

Solución de yema de huevo

Telurito

Ácido acético 5M

Agua de peptona

2.5. Técnicas y Métodos

2.5.1. Muestreo

El muestro para el análisis fisicoquímico se realizó de la siguiente manera teniendo en cuenta la información que se encuentra en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 0004:1984 “Leche y productos lácteos. Muestreo”.

1. Mezclar toda la leche contenida en el bidón o en el tanque.
2. Tomar 100 mL de cada tanque en un frasco estéril
3. Rotular los recipientes con la información necesaria.

4. Colocar los recipientes con la muestra en los coolers
5. Añadir los geles

Para el análisis microbiológico se tomó 500mL de muestra de cada tanque en frascos de vidrio estériles, tal y como se indica en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1529-2:1999. “Control microbiológico de los alimentos”, en la que se describe la toma, envío y preparación de muestras para este análisis. El muestro se realizó por 3 semanas y por duplicado obteniéndose 18 muestras en total.

Tabla 1-2: Número de muestras para el análisis microbiológico

	CA 1	CA 2	CA 3
Semana 1	M1, M´1	M2, M´2	M3, M´3
Semana 2	M4, M´4	M5, M´5	M6, M´6
Semana 3	M7, M´7	M8, M´8	M9, M´9

Realizado por: Llumán, Priscila; Ramírez, Melissa, 2020

2.5.2. Análisis Físicoquímico

El análisis físicoquímico se llevó a cabo en el analizador de leche LACTOSAN, el cual permite determinar grasa, sólidos no grasos, proteínas, lactosa, adición de agua, temperatura (°C), punto de congelación, sales, sólidos totales, densidad y conductividad. Para ello se realizaron los siguientes pasos los cuales se encuentran en el manual de manejo del mismo:

1. Realizar las soluciones de limpieza roja y azul al 3%
2. Conectar el cable de fuente de energía, el regulador del voltaje y colocar el electrodo al analizador.
3. Encender el equipo
4. En los recipientes propios del equipo colocar la muestra hasta la penúltima línea, previa mezcla de la misma.
5. Colocar el recipiente en el lugar del análisis y pulsar la opción “vaca”, una vez terminado el análisis retirar el recipiente. Continuar así con 5 muestras.
6. Ubicar el recipiente con agua destilada en el lugar del análisis y pulsar la opción “LIMPIEZA”.
7. Colocar las 5 muestra siguientes
8. Realizar la limpieza con la solución azul.
9. Una vez terminado los análisis limpiar con agua destilada y la solución roja

2.5.2.1. Determinación de cloruros

Los pasos para la determinación de cloruros se encuentran en la prueba de Quantofix Chloride.

1. Agitar la muestra.
2. Colocar la tirilla en la muestra por 1 segundo
3. Sacar la tirilla, retirar el sobrante de producto.
4. Esperar 1 minuto, observar y comparar el color.

2.5.2.2. Determinación de peróxidos

Los pasos para la determinación de cloruros se encuentran en la prueba de Peroxide Bart-Vat

1. Agitar la muestra.
2. Colocar la tirilla en la muestra por 1 segundo y remover
3. Sacar la tirilla, retirar el sobrante de producto.
4. Esperar 10 segundos, observar y comparar el color.

2.5.2.3. Determinación de antibióticos

La determinación de la presencia de antibióticos en la leche se realizó con la prueba de tira combo auroflow BTS, para la cual se desarrolló el siguiente procedimiento.

1. Cortar un pocillo y sacar una tirilla por cada muestra que se vaya analizar, dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente.
2. Agitar la muestra y colocar 5 mL en un frasco limpio
3. Colocar una punta desechable en la pipeta
4. Pipetear 200uL de leche en el pocillo de reacción
5. Con la misma pipeta aspirar de arriba abajo 10 veces, evitando la formación de burbujas
6. Incubar la muestra en el pocillo a 25 °C por 3 min
7. Colocar la tirilla en el pocillo de manera que las flechas apunten hacia abajo. La tirilla debe colocarse verticalmente y debe introducirse hasta el fondo del pocillo.
8. Después de 4 min, sacar la tirilla colocarla en forma horizontal con el lado sin marcar hacia arriba
9. Examinar visualmente la intensidad de la señal de cada línea y compararla con la línea de control

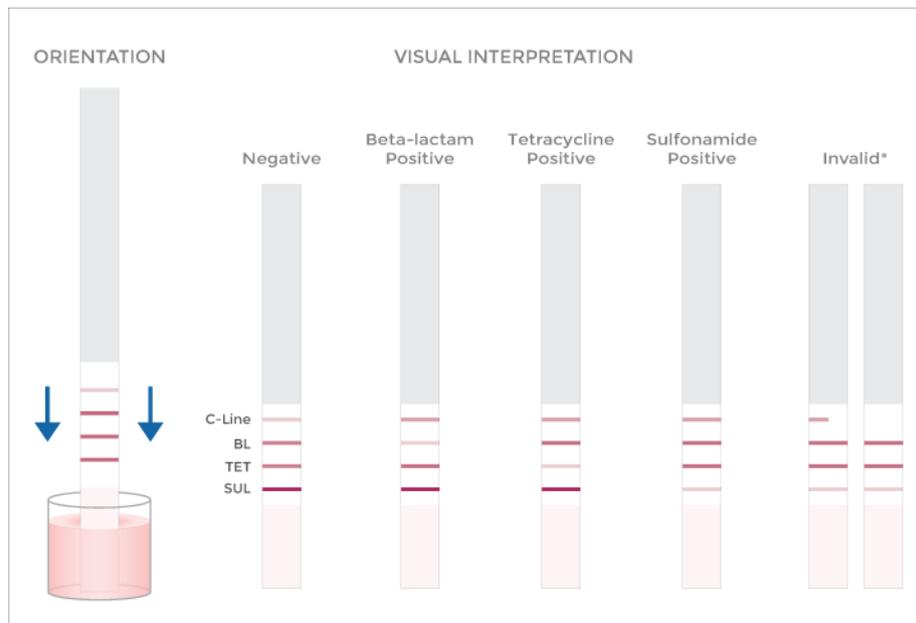


Gráfico 1- 2: Interpretación visual de las tirillas de antibiótico

Fuente: Manual de la prueba combo auroflow BTS

2.5.3. Análisis microbiológico

2.5.3.1. Preparación de medios de cultivo para siete cajas Petri.

La preparación de los medios de cultivo se realizó aplicando la NTE INEN 1529-1:2013 Control Microbiológico de los Alimentos. Preparación De Medios De Cultivo Y Reactivos

A. Agua de Peptona

1. Determinar el número de diluciones a preparar
2. Pesar 0.1 g de agua de peptona por cada 100mL de agua destilada
3. Colocar la solución en el autoclave a 121°C durante 15 minutos a 15 PSI
4. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, realizar las diluciones seriadas

B. Caldo M17

1. Determinar el número de placas Petri que deberán ser preparadas de acuerdo a lo que se desee analizar
2. Diluir 5,3235 g del medio en 126 mL de agua destilada en un Erlenmeyer, para siete cajas.
3. Pesar 15g de Bacto Agar para el volumen requerido y añadir al medio.
4. Calentar el medio hasta disolución completa.
5. Autoclavar el medio durante 15 min a 15 PSI a 121 °C.
6. Colocar el medio en la cámara de flujo laminar y colocar 18mL del medio en las cajas.
7. Esperar a que solidifiquen, tapar las cajas y codificar.

8. Colocar en refrigeración

C. Caldo MRS

1. Determinar el número de placas Petri que deberán ser preparadas de acuerdo a lo que se desee analizar
2. Diluir 6,93 g del medio en 126 mL de agua destilada en un Erlenmeyer, para siete cajas.
3. Pesar Bacto agar para el volumen requerido y añadir a la dilución anterior
4. Calentar hasta disolver el medio por completo
5. Acidificar el medio con una solución de ácido acético 5M hasta llegar a un pH de 5.4
6. Autoclavar durante 15 min a 15 PSI a 121 °C
7. Colocar el medio en la cámara de flujo laminar y colocar 18 mL del medio en las cajas.
8. Esperar a que solidifiquen, tapar las cajas y codificar.
9. Colocar en refrigeración.

D. Agar PCA (Plate Cunt Agar)

1. Determinar el número de placas Petri que deberán ser preparadas de acuerdo a lo que se desee analizar.
2. Diluir 2,961 g del medio en 126 mL de agua destilada en un Erlenmeyer, para siete cajas.
3. Calentar hasta disolver el medio por completo
4. Autoclavar el medio durante 15 min a 15 PSI a 121 °C
5. Colocar el medio en la cámara de flujo laminar y colocar 18 mL del medio en las cajas.
6. Esperar a que solidifiquen, tapar las cajas y codificar.
7. Colocar en refrigeración

E. Agar Saboraud

1. Establecer el número de cajas Petri a realizar con este medio.
2. Calcular el volumen requerido y la cantidad de agar necesario para el mismo.
3. Diluir 7,812 g del medio en 126 mL de agua destilada en un Erlenmeyer, para siete cajas.
4. Calentar hasta disolver el medio por completo
5. Autoclavar durante 15 min a 15 PSI a 121 °C
6. Colocar el medio en la cámara de flujo laminar y colocar 18 mL del medio en las cajas.
7. Esperar a que solidifiquen, tapar las cajas y codificar.
8. Colocar en refrigeración

F. Agar MacConkey

1. Determinar el número de placas Petri que deberán ser preparadas de acuerdo a lo que se desee analizar
2. Disolver 51,5 g de agar MacConkey en un Erlenmeyer con 126mL de agua destilada, para siete cajas Petri
3. Calentar hasta disolver el medio por completo
4. Autoclavar el medio durante 15 min a 15 PSI a 121 °C
5. Llevar el medio de cultivo a la cámara de flujo laminar encendida
6. Colocar aproximadamente 18mL del medio en cajas Petri de vidrio y esperar a que se solidifique.
7. Colocar la tapa, rotular y refrigerar

G. Agar Baird Parker

1. Determinar el número de placas Petri que deberán ser preparadas de acuerdo a lo que se desee analizar.
2. Pesar 8,3757g de agar Baird Parker y disolver en 126mL de agua destilada, para siete cajas.
3. Calentar hasta ebullición agitando frecuentemente para conseguir la completa disolución.
4. Autoclavar el medio durante 15 minutos a 121°C a 15 PSI
5. Añadir la solución de telurito de potasio y la emulsión de yema de huevo.
6. Colocar aproximadamente 18mL del medio en cajas Petri de vidrio y esperar que se solidifique.
7. Colocar la tapa, rotular y refrigerar

Preparación del Telurito de potasio

1. Pesar 1 g de telurito de potasio por cada 100mL de agua destilada
2. Calentar el medio hasta disolver por completo
3. Colocar la cantidad necesaria sobre el medio Baird Parker

Emulsión de yema de huevo

1. Utilizar huevos de gallinas frescos
2. Lavar el huevo de gallina con cepillo, jabón y agua tibia
3. Sumergir el huevo durante una hora en alcohol al 70%
4. Sacar la yema con ayuda de una pinza estéril y pesarla en un Erlenmeyer
5. El peso multiplicar por cuatro y es la cantidad de agua estéril que se debe añadir a la yema y agitar con ayuda de una varilla estéril.

6. Colocar la cantidad de emulsión de yema necesaria al medio Baird Parker cuando este se encuentre tibio, para evitar que la yema se cocine.

H. Agar para recuento en placa (PCA)

1. Determinar el número de placas Petri que deberán ser preparadas de acuerdo a lo que se desee analizar
2. Disolver 23,5g de PCA en un Erlenmeyer en 1 litro de agua destilada.
3. Calentar hasta ebullición agitando frecuentemente para conseguir la completa disolución.
4. Autoclavar el medio durante 15 minutos a 121°C a 15 PSI
5. Llevar el medio de cultivo a la cámara de flujo laminar encendida
6. Colocar aproximadamente 18 mL del medio en cajas Petri de vidrio y esperar a que se solidifique.
7. Colocar la tapa, rotular y refrigerar

I. Agar Tripticasa Soya

1. Establecer el número de cajas Petri a realizar con este medio.
2. Calcular el volumen requerido y la cantidad de agar necesario para el mismo.
3. Diluir 4,662 g del medio en 126 mL de agua destilada en un Erlenmeyer, para siete cajas.
4. Autoclavar durante 15 min a 15 PSI a 121 °C
5. Colocar el medio en la cámara de flujo laminar y colocar 18 mL del medio en las cajas.
6. Esperar a que solidifiquen, tapar las cajas y codificar.
7. Colocar en refrigeración

J. Caldo de infusión cerebro-corazón

1. Determinar el número de tubos que deberán ser preparadas de acuerdo a lo que se desee analizar
2. Disolver 6,66g de infusión cerebro-corazón en un Erlenmeyer en 180mL de agua destilada.
3. Calentar hasta ebullición agitando frecuentemente para conseguir la completa disolución.
4. Autoclavar el medio durante 15 minutos a 121°C a 15 PSI.
5. Llevar el medio de cultivo a la cámara de flujo laminar encendida y colocar aproximadamente 5mL del medio en tubos de vidrio.
6. Rotular y refrigerar

K. Medio SIM

1. Determinar el número de tubos que deberán ser preparadas de acuerdo a lo que se desee analizar (2 tubos).
2. Disolver 0,22 g del medio SIM en un Erlenmeyer en 15 mL de agua destilada
3. Calentar hasta ebullición agitando frecuentemente para conseguir la completa disolución.
4. Autoclavar el medio durante 15 minutos a 121°C A 15 PSI.
5. Llevar el medio de cultivo a la cámara de flujo laminar encendida y colocar aproximadamente 5mL del medio en tubos de vidrio.
6. Rotular y refrigerar

L. Agar Citrato de Simmons

1. Determinar el número de tubos que deberán ser preparadas de acuerdo a lo que se desee analizar (2 tubos).
2. Disolver 0,18 g del medio en un Erlenmeyer en 15 mL de agua destilada.
3. Calentar hasta ebullición agitando frecuentemente para conseguir la completa disolución.
4. Autoclavar el medio durante 15 minutos a 121°C a 15 PSI
5. Llevar el medio de cultivo a la cámara de flujo laminar encendida
6. Colocar aproximadamente 3 mL del medio en tubos de vidrio.
7. Rotular y refrigerar

M. Kligler Hierro Agar

1. Determinar el número de tubos que deberán ser preparadas de acuerdo a lo que se desee analizar (2 tubos).
2. Disolver 0,39g del medio en un Erlenmeyer en 15 mL de agua destilada.
3. Calentar hasta ebullición agitando frecuentemente para conseguir la completa disolución.
4. Autoclavar el medio durante 15 minutos a 121°C a 15 PSI.
5. Llevar el medio de cultivo a la cámara de flujo laminar encendida
6. Colocar aproximadamente 3mL del medio en tubos de vidrio.
7. Rotular y refrigerar.

N. Urea Agar

1. Determinar el número de tubos que deberán ser preparadas de acuerdo a lo que se desee analizar (2 tubos).

2. Disolver 0,15 g del medio en un Erlenmeyer en 15 mL de agua destilada.
3. Calentar hasta ebullición agitando frecuentemente para conseguir la completa disolución.
4. Autoclavar el medio durante 15 minutos a 121°C
5. Llevar el medio de cultivo a la cámara de flujo laminar encendida
6. Colocar aproximadamente 3mL del medio en tubos de vidrio.
7. Rotular y refrigerar

2.5.3.2 *Tinción GRAM*

1. Con ayuda de un asa de siembra tomar una colonia y extenderla en un porta objetos.
2. Añadir una gota de cristal violeta durante 1 minuto y enjuagar con agua destilada.
3. Añadir una gota de lugol durante 1 minuto y enjuagar con agua destilada.
4. Añadir una gota de decolorante durante 30 segundos y enjuagar con agua destilada.
5. Añadir una gota de safranina durante 1 minuto y enjuagar con agua destilada.
6. Dejar secar y colocar una gota de aceite de inmersión.
7. Observar al microscopio con el lente 100x.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

A continuación, se presentan los resultados de:

- La lista de chequeo: para centros de acopio de leche cruda, medios de transporte de leche cruda que incluye el tanquero y los bidones de los proveedores.
- Análisis fisicoquímico de leche cruda
- Análisis microbiológico de la leche cruda
- Identificación de los microorganismos aislados

3.2. Lista de chequeo: Requisitos para centros de acopio de leche cruda

La lista de verificación emitida por el Manual de Agrocalidad es una herramienta que ayuda a establecer de forma eficaz y eficiente la vigilancia y el control de la calidad e inocuidad de la leche cruda en centros de acopio, silos de industrias lácteas y vehículos que transportan leche.

Tabla 1-3: Resultados de la lista de chequeo: Requisitos para centros de acopio de leche cruda

REQUISITOS	CA 1		CA 2		CA 3		OBSERVACIONES
	C	NC	C	NC	C	NC	
El centro de acopio controla la recepción de leche cruda a diario de todos sus proveedores?	X		X		X		En todos los centros de acopio se lleva un registro diario del volumen de leche que entrega cada proveedor
El centro de acopio controla la trazabilidad del producto acopiado?		X		X		X	No existe control en cuanto a la trazabilidad de la leche
El centro de acopio realiza las pruebas para comprobar por análisis sensorial las características organolépticas?	X		X		X		Los ensayos organolépticos se realizan de cada uno de los proveedores que llegan al centro de acopio
El centro de acopio hace pruebas para comprobar si la leche cumple los requisitos normativos de leche cruda?	X		X		X		Los centros de acopio realizan determinación de antibióticos, densidad y acidez, pero no todas las pruebas exigidas por la NTE INEN 9
En los centros de acopio, los tanques de depósito de almacenamiento de leche cruda cuenta con termómetros funcionales y calibrados?	X		X		x		Los centros de acopio cuentan con termómetros funcionales pero no hay evidencia de la calibración de los mismos
Se verifica y registra la temperatura de refrigeración durante el transporte desde el centro de acopio hacia la industria y en el momento de recepción en la industria?	X		X		X		El tanquero que transporta la leche cuenta con un termómetro digital lo que permite un control adecuado de la temperatura en el trayecto del centro de acopio a la industria láctea.
La leche enfriada en los centros de acopio se destina únicamente a plantas de proceso de leche o procesos posteriores con la finalidad de garantizar la inocuidad de los productos más no para la venta directa al consumidor?	X			X	X		En el caso del centro de acopio CA 2, la leche se vende para consumo humano
El centro de acopio cuenta con un laboratorio propio básico o con el servicio de un laboratorio legalmente constituido y acreditado en el OAE para análisis fisicoquímico, sensorial y microbiológico de la leche cruda?		X		X		X	Los centros de acopio cuentan con un lugar destinado para los análisis fisicoquímicos pero mas no para pruebas microbiológicos, además no se encuentran acreditados

El centro de acopio cuenta al menos con áreas de: recepción, análisis, enfriamiento, y entrega de leche cruda?	X		X		X		Todos los centros cuentan con estas áreas básicas
El centro de acopio cuenta con instalaciones dedicadas exclusivamente para el fin con el cual fueron creadas?	X		X		X		Las instalaciones son usadas para los fines para los que fueron creadas
El centro de acopio se ubica en un lugar geográfico alejado de fuentes contaminantes?	X		X		X		Los centros de acopio se encuentran alejados de toda fuente contaminación.
El centro de acopio cuenta con un patio de cemento de tamaño suficiente para el ingreso de los vehículos y fácil desembarque de leche, con pendientes suficientes (2%) para asegurar el rápido drenaje?	X			X	X		Tan solo el centro de acopio CA 2 no cuenta con el patio de cemento.
El centro de acopio cuenta con una fácil evacuación de aguas de lavado y de lluvia al sistema de alcantarillado y/o sistema de descarga de aguas servidas?	X			X	X		El sistema de desecho del agua contaminada es correcto, pero en el centro de acopio CA 2 no cuenta con un sistema de alcantarillado
El centro de acopio cuenta con una plataforma o andén de recepción, techado y diseñado para lograr una operación de carga y descarga fácil, construida de cemento, pudiendo revestirse con material resistente al ácido láctico, facilitando el lavado con pendiente hacia desagües conectados a la red de evacuaciones de aguas?	X		X		X		
El centro de acopio cuenta con un área cerrada de construcción sólida para albergar, él o los tanques de refrigeración y equipos auxiliares; y dispone de una adecuada ventilación, la misma que es protegida o limitada con una malla plástica?	X		X		X		
El centro de acopio lechero cuenta con un laboratorio básico ubicado en un área específica para este fin? (aplica para centros de acopio con capacidad de recepción mayor a los 2000 litros diarios)	X		X		X		
El laboratorio básico se encuentra en buenas condiciones, ordenado y limpio? (aplica para centros de acopio con capacidad de recepción mayor a los 2000 litros diarios)		X		X		X	Los laboratorios de los diferentes centros de acopio no se encuentran en buenas condiciones higiénicas para la ejecución de los análisis.
El centro de acopio lechero cuenta con un área destinada exclusivamente a la limpieza, desinfección y almacenamiento de recipientes de leche cruda? El centro de acopio provee de detergente, vapor de agua, agua caliente, sanitizantes, cepillos y utensilios de limpieza en general a los medios de transporte de leche cruda para que ejecuten la limpieza y desinfección de los recipientes una vez que dejen la leche en el centro de acopio?		X		X		X	Los centros de acopio cuentan con suministro de agua fría para el lavado de los bidones y con detergente. Cabe recalcar que el centro de acopio CA 1 no cuenta con esta área
El área destinada exclusivamente a la limpieza, desinfección y almacenamiento de recipientes de leche se encuentra protegida contra agentes externos de contaminación (techo) y tiene un área proporcionalmente suficiente con relación al número de recipientes que se manipulan en el centro de acopio lechero?		X		X		X	El área de limpieza de los bidones no cuenta con protección a agentes externos aumentando la posibilidad de contaminación
El área destinada exclusivamente a la limpieza, desinfección y almacenamiento de recipientes de leche se encuentra en buenas condiciones, ordenada y limpia? Se ha establecido un área destinada a limpieza y desinfección de los recipientes identificado un área limpia y un área sucia?		X		X		X	Los centros no cumplen con protección para esta área.
El centro de acopio lechero cuenta con servicios sanitarios y área de vestidores ubicados fuera de las instalaciones de manipulación de leche?	X			X		X	Tan solo el centro de acopio CA 1 cuenta con áreas de vestidores
Los servicios sanitarios y área de vestidores se encuentran en buenas condiciones, ordenados y limpios?		X		X		X	Los servicios sanitarios se encuentran en malas condiciones higiénicas en todos los casos estos pasan sucios e incluso se observan

						la presencia de insectos	
El centro de acopio cuenta con un área exclusiva para el almacenamiento de insumos, separada de las instalaciones de manipulación de leche, identificada y rotulada?		X		X		X	Cuentan con bodega pero muchos insumos de limpieza son almacenados fuera de esta
El área exclusiva para el almacenamiento de insumos se encuentra en buen estado, ordenada, limpia, seca y libre de acumulación de materias extrañas?		X		X		X	El área se encuentra desordenada y se observa la presencia de insectos y materias extrañas
El sistema de medición del volumen o peso de la leche es adecuadamente manipulado e impide la contaminación y alteración de la calidad de la leche?		X		X		X	La medición del volumen es adecuado mas no la manipulación de los instrumentos, así como la falta del uso del equipo de protección personal
El centro de acopio cuenta con un sistema higiénico que permita medir el volumen o peso de la leche recibida con exactitud?		X		X		X	Los centros cuentan con instrumentos adecuados mas no correctamente higienizados
El centro de acopio lechero cuenta con un sistema automatizado para el lavado de recipientes? (Aplicará centros de acopio con capacidad de recepción mayor a los 10.000 litros diarios)	NO APLICA						
El centro de acopio lechero cuenta con un sistema de enfriamiento rápido de la leche recibida? (Aplica para centros de acopio con capacidad de recepción mayor a 10.000 litros diarios.)	NO APLICA						
El centro de acopio cuenta con un sistema de suministro de vapor o agua para el lavado de equipos, recipientes y utensilios? (Aplica para centros de acopio con capacidad de recepción mayor a 10.000 litros diarios.)	NO APLICA						
El centro de acopio lechero cuenta con abastecimiento de agua potable permanente?		X	X		X		En el caso del centro de acopio CA 1 no cuenta con agua permanente ya que en ocasiones se debe buscar en cisternas externas
En caso de contar con sistemas de almacenamiento de agua, el centro de acopio realiza un tratamiento adecuado previo a su utilización en las operaciones?	NO APLICA						
El centro de acopio cuenta con registros que demuestren la calidad del agua utilizada?		X		X		X	

Fuente: AGROCALIDAD, 2013

Realizado por: Llumán, Priscila; Ramírez, Melissa, 2020

En la tabla 2-3 se presentan los resultados en porcentaje del cumplimiento y no cumplimiento de la lista de chequeo aplicado a los centros de acopio.

Tabla 2-

Centro de acopio	% Cumplimiento	% No Cumplimiento	% No Aplica
CA1	46,88	40,63	12,5
CA2	37,50	50	12,5
CA3	46,88	40,63	12,5

Realizado por: Llumán, Priscila; Ramírez, Melissa, 2020

3:Porcentaje de cumplimiento y no cumplimiento de los centros de acopio

Los centros CA 1 y CA 3 tienen mayor porcentaje de cumplimiento (46,88%), mientras que CA 2 presentó un menor porcentaje (37,50 %). El no cumplimiento de los tres centros de acopio se ve reflejado en la falta de aseo e infraestructura, al ser evidente la falta de aseo de áreas como bodegas, baños y vestidores en donde se puede apreciar la presencia insectos y al no contar con áreas específicas destinadas para almacenar artículos o para colocar los instrumentos de medición, en donde muchos de ellos son colocados en el suelo, lo que favorece la proliferación de microorganismos generando una contaminación cruzada. Los tres centros de acopio cuentan con un laboratorio básico para la ejecución de análisis fisicoquímicos, más no para realizar análisis microbiológicos pese a que existen equipos y reactivos para su ejecución.

3.3. Lista de chequeo: Requisitos de medios de transporte de leche cruda

El tanquero que transporta la leche desde el centro de acopio pertenece a la industria procesadora que compra la leche. Este tanquero recoge la leche de los tres centros de acopio en ruta por lo cual fue evaluado. También se aplicó la lista de chequeo a los proveedores evaluando el transporte que ocupan del lugar de ordeño hasta el centro.

3.2.1. Requisitos de medios de transporte de leche cruda: tanquero

Tabla 3-3: Resultados de la lista de chequeo aplicada al tanquero.

N°	Requisito	No cumple	Si cumple
1	El tanque de almacenamiento de leche del medio de transporte, así como sus accesorios complementarios, se encuentran fabricados de acero inoxidable y/o aluminio?		X
2	El tanque de leche cruda se encuentra en buen estado, libre de lubricantes, ausencia de fugas o derrames de leche u otro tipo de agente contaminante?		X
3	Para los tanqueros de transporte de leche cruda (camiones cisterna o de enfriamiento), las tuberías de carga y descarga de leche que forman ángulos están provistas en su interacciones de uniones cruz o codos con tapa?		X
4	En los tanqueros de transporte de leche cruda con más de 2000 litros (camiones cisterna o de enfriamiento) existe un equipamiento aislante y/o equipo de refrigeración para mantener la leche cruda a 4C +/- 2C a fin de garantizar la inocuidad de la leche? Por su parte, en los tanqueros de transporte de leche con menos de 2000 litros se ha fijado rutas de recolección considerando distancia del recorrido, tiempos de recorridos, y hora del recorrido con la finalidad de salvaguardar la inocuidad de la leche cruda?		X
5	Los tanques cisterna cuentan con un sistema de control de temperatura que se encuentra en perfecto funcionamiento?		X
6	En el medio de transporte se establece la prohibición del transporte de otras materiales sólidos, líquidos y/o gaseosos junto con la leche cruda?		X
7	Se encuentra debidamente identificado el medio de transporte con rotulación informativa sobre su contenido?		X
8	En el medio de transporte los dispositivos de cierre (tapas) impiden el almacenamiento de residuos, son fáciles de operar y fáciles de lavar y desinfectar?		X
9	El diseño del medio de transporte permite la fácil evacuación de las aguas de lavado?		X
10	Se mantiene un procedimiento de limpieza y desinfección de los recipientes		X

	de leche después de su utilización? Se cuenta con instrumentos y/o utensilios de limpieza únicos y específicos para este fin; y, son almacenados de forma que éstos mantengan sus condiciones para su uso?		
--	--	--	--

Fuente: AGROCALIDAD, 2013

Realizado por: Llumán, Priscila; Ramírez, Melissa, 2020

La aplicación de la lista de verificación al tanquero que recoge la leche de los tres centros de acopio y la transporta a la industria láctea arrojó resultados positivos en cuanto a este medio de transporte, ya que cumple con todos los requerimientos mencionados en la lista de chequeo lo que permite según Agrocalidad el correcto transporte de la leche cruda y por ende asegurar que el producto llegue en las mejores condiciones. En la lista de chequeo se evaluó: el material de fabricación: la limpieza, el control de la temperatura y si el transporte es exclusivo para la leche.

El control adecuado de la temperatura en este tipo de transporte ayuda a mantener la calidad de la leche, la cual previamente fue sometida a pruebas fisicoquímicas (determinación de acidez, peso y antibióticos) para aceptar o rechazar el transporte de dicho producto.

El material con el cual es fabricado el tanque, así como su limpieza, minimizan la contaminación microbiana y el crecimiento del mismo, asegurando de esta manera una mejor calidad en la materia prima para la elaboración de otros productos lácteos como yogurt, queso.

3.2.2. Resultado de la lista de chequeo: Proveedores

La lista de chequeo también ha sido elaborada para evaluar a cada uno de los proveedores que entregan la leche cruda a los diferentes centros de acopio. A continuación, se presenta una tabla con los resultados.

Tabla 4-3: Resultados de la lista de chequeo aplicado a los proveedores

Pregunta	Categoría	CA 1		CA 2		CA 3	
		n = 33	%	n = 51	%	n = 50	%
1. ¿El tanque de almacenamiento de leche del medio de transporte, así como sus accesorios complementarios, se encuentran fabricados de acero inoxidable y/o aluminio?	C	29	87,88	47	92,16	41	82
	NC	4	12,12	4	7,84	9	18
2. ¿El tanque de leche cruda se encuentra en buen estado, libre de lubricantes, ausencia de fugas o derrames de leche u otro tipo de agente contaminante?	C	29	87,88	48	94,12	48	96
	NC	4	12,12	3	5,88	2	4
3. ¿Para los tanqueros de transporte de leche cruda (camiones cisterna o de enfriamiento), las tuberías de carga y descarga de leche que forman ángulos están provistas en sus interacciones de uniones cruz o codos con tapa?	NO APLICA						
4. En los tanqueros de transporte de leche cruda con más de 2000 litros (camiones cisterna o de enfriamiento) existe un equipamiento aislante y/o equipo de refrigeración para mantener la leche cruda a 4C +/- 2C a fin de garantizar la inocuidad de la leche? Por su parte, en los tanqueros de transporte de leche con menos de 2000 litros se ha fijado rutas de recolección considerando distancia del recorrido, tiempos de recorridos, y hora del recorrido con la finalidad de salvaguardar la inocuidad de la leche.	NO APLICA						
5. ¿Los tanques cisterna cuentan con un sistema de control de temperatura que se encuentra en perfecto funcionamiento?	NO APLICA						
6. ¿En el medio de transporte se establece la prohibición del transporte de otros materiales sólidos, líquidos y/o gaseosos junto con la leche cruda?	C	0	0	0	0	0	0
	NC	32	100	51	100	50	100
7. ¿Se encuentra debidamente identificado el medio de transporte con rotulación informativa sobre su contenido?	C	0	0	0	0	0	0
	NC	33	100	51	100	50	100
8. ¿En el medio de transporte los dispositivos de cierre (tapas) impiden el almacenamiento de residuos, son fáciles de operar y fáciles de lavar y desinfectar?	C	28	84,85	36	70,59	39	78
	NC	5	15,15	15	29,41	11	22
9. ¿El diseño del medio de transporte permite la fácil evacuación de las aguas de lavado?	C	23	69,7	49	96,08	44	88

	NC	10	30,3	3	5,88	6	12
10. ¿Se mantiene un procedimiento de limpieza y desinfección de los recipientes de leche después de su utilización? Se cuenta con instrumentos y/o utensilios de limpieza únicos y específicos para este fin; y son almacenados de forma que éstos mantengan sus condiciones para su uso?	C	30	9,09	10	19,61	10	20
	NC	3	90,91	41	80,39	40	80

***C= cumple NC= no cumple**

Fuente: AGROCALIDAD, 2013

Realizado por: Llumán, Priscila; Ramírez, Melissa, 2020



Gráfico 1-3: Entrega de leche a través de bidones o botellas de plástico.

Realizado por: Llumán, Priscila; Ramírez, Melissa, 2020

La lista de chequeo, menciona que el material del bidón de transporte de leche cruda desde el ordeño hasta el centro de acopio tiene que ser de acero inoxidable o aluminio; por lo que el nivel de cumplimiento de los 3 centros es aceptable, con un porcentaje de 87.88% para CA 1, 92.16% para la CA 2 y 82% para CA.

Aquellos que no cumplen con este requisito son los proveedores que entregan la leche en recipientes o bien en botellas de plástico (Gráfico 2), los mismos que al no lavarse de manera adecuada quedan con humedad, ayudando a que las bacterias crezcan y se multipliquen. Algunos proveedores afirman que usan los bidones de plástico debido a que el costo es accesible para sus bolsillos o por el hecho de que sus recipientes de aluminio fueron robados.

Los bidones de transporte de leche deben encontrarse en buenas condiciones, libres de lubricantes, ausencia de fugas u otro tipo de agentes que contribuyan al incremento de la carga microbiana. El nivel de cumplimiento de este parámetro es bastante aceptable obteniendo valores de 87.88%, 94.12% y 96% para los centros CA 1, CA 2 y CA 3, respectivamente.

En cuanto a la prohibición del transporte de otros materiales sólidos, líquidos y/o gaseosos junto con la leche cruda, los proveedores desconocen acerca de que los bidones deben ser usados con el único fin de transportar leche cruda, los mismos que deben estar debidamente rotulados con información sobre su contenido es por ello, que existe un incumplimiento del 100% de este parámetro. En el Gráfico podemos evidenciar que los bidones de leche cruda se transportan junto con otros materiales como hierba o legumbres y en el mayor de los casos con animales o en vehículos con restos de excremento de animales.

Los medios de transporte deben contar con dispositivos de cierre (tapas) que impidan el almacenamiento de residuos, sean fáciles de operar y fáciles de lavar y desinfectar, por lo que

existe un cumplimiento del 84.85% para CA 1, 70.59% para CA 2 y 78% para CA 3. El no cumplimiento se debe a que ciertos proveedores no colocan tapas en los bidones permitiendo el ingreso de impurezas e insectos a la leche cruda durante todo su trayecto hasta el centro de acopio.

El parámetro “El diseño del medio de transporte debe permitir la fácil evacuación de las aguas de lavado”, por lo que este ítem presenta un cumplimiento aceptable para los centros CA 2 (96.08%) y CA 3 (88%); mientras que el cumplimiento de CA 1 se encuentra muy bajo con un 69.7%. Cabe destacar, que la mayoría de proveedores transportan los bidones de leche a pie o en moto, otros en camioneta donde existe una fácil evacuación de aguas de lavada y muy pocos proveedores lo realizan en vehículos tipo auto donde la probabilidad de evacuación de las aguas es nula.

Los bidones deben ser limpiados y desinfectados inmediatamente después de su utilización para lo cual, el centro de acopio debe proveer de detergente, vapor de agua, agua caliente, sanitizantes, cepillos y utensilios de limpieza en general a los proveedores de leche cruda para que ejecuten la limpieza y desinfección de los recipientes una vez que dejen la leche en el centro de acopio (Agrocalidad, 2012). Este ítem debería ser cumplido al 100% pero lamentablemente el incumplimiento se encuentra por encima del 50%, presentando valores elevados como 90.91% para CA 1, 80.39% para CA 2 y 80% para CA 3; aunque el mayor centro con incumplimiento es el de CA 1. Al realizar la pregunta a los proveedores acerca de cómo realizan la limpieza y desinfección de los recipientes, algunos afirman que lavan los recipientes en su casa con agua caliente; mientras que otras personas afirman que simplemente realizan el lavado con axión y agua fría.

3.4. Análisis fisicoquímicos

En la tabla 6-3 se muestran los resultados del análisis fisicoquímico realizados en las muestras leche (grasa, sólidos no-grasos, densidad, proteínas, lactosa, adición de agua, temperatura (°C), pH, punto de congelación, sólidos totales y conductividad).

Tabla 5-3: Resultados de los análisis fisicoquímicos de la leche cruda

Parámetro fisicoquímico	Referencias	CENTROS DE ACOPIO		
		CA 1	CA 2	CA 3
% Grasa	3,0*	4,39 ± 0,61	3,97 ± 0,25	4,49 ± 0,64
% Sólidos no grasos	8,2*	8,51 ± 0,12	8,58 ± 0,19	8,67 ± 0,11
Densidad (20°C)	1,028-1,032*	1,028 ± 0,66	1,029 ± 0,64	1,029 ± 0,60
% Lactosa	4,9***	4,68 ± 0,06	4,72 ± 0,10	4,77 ± 0,06
% Sales	0,9***	0,7 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,71 ± 0,01
% Proteína	2,9*	3,1 ± 0,05	3,13 ± 0,07	3,15 ± 0,04
Punto de congelación	-0,536 - 0,512*	-0,532 ± 0,02	-0,55 ± 0,02	-0,56 ± 0,01
% Sólidos totales	11,2*	12,9 ± 0,65	12,76 ± 0,71	13,33 ± 0,84
pH	6,5 – 6,8**	7,13 ± 0,10	7,08 ± 0,05	6,96 ± 0,07
Prueba de Antibiótico	Negativo*	Negativo	Negativo	Negativo
Prueba de cloruros ppm	1000****	1000	1000	1000
Peróxido ppm	Negativa*	0	0	0

Fuente: *NTE INEN 9, 2012; **Manual de AGROCALIDAD, 2013; *** Manual de Normas de Calidad de Leche Cruda**** Xingguang et al., 2018

Realizado por: Llumán, Priscila; Ramírez, Melissa, 2020

Con respecto al contenido de grasa, en los tres centros de acopio el resultado es mayor a 3% que exige la norma NTE INEN, observándose una desviación alta debido a que la leche no presenta una composición química exacta cada día de procesamiento, ya que proviene de diferentes sectores y proveedores. La variación de la cantidad de grasa de los diferentes centros de acopio, pese a que se encuentran en el mismo cantón, puede ser debido a que los bovinos reciben una alimentación diferente y, por tanto, cuanto mayor sea la concentración de fibra, mayor es la de la grasa en la leche debido a la proporción de ácidos grasos volátiles producidos en el rumen (González et al., 2010, p. 4).

En un estudio realizado por (Calderón et al., 2006, pp. 733 - 734) en el que evaluaron la calidad de la leche proveniente de 1.159 fincas ubicadas en diferentes regiones de Colombia, clasifican a la leche cruda de acuerdo a su porcentaje de grasa en excelente, buena, regular y mala si presentan un porcentaje >3.5, 3.5 – 3.3, 3.3 – 3.0 y <3.0, respectivamente En este estudio la leche presenta un porcentaje de grasa mayor a 3.5 para los tres centros de acopio, por lo que se consideraría a este producto como excelente.

La Norma NTE INEN 9 indica que la densidad de la leche cruda a 20°C debe oscilar entre 1,028-1,032 por lo que si este parámetro se encuentra fuera de los rangos normales puede ser

indicativo de una adulteración tal y como lo explica (Calderón, Rodríguez y Martínez, 2013) en su estudio de “Determinación de adulterantes en leches crudas acopiadas en procesadoras de quesos en Montería, Córdoba”. En los resultados se observa que los centros de acopio: CA 1 (1,028), CA 2(1,029) y CA 3 (1,029) se encuentran dentro de los rangos permitidos por la norma. Además, se observa una diferenciación mínima de la densidad entre cada centro de acopio, debido a que este parámetro fisicoquímico varía en función de algunos componentes de la leche, tales como: cantidad de agua, grasa, sólidos totales, proteína y varía con la temperatura (González et al., 2010, p. 4).

El valor de los sólidos no grasos (SNG) se obtiene mediante la diferencia entre los de sólidos totales y el porcentaje de grasa. Los SNG están constituidos por proteínas, lactosa y sales minerales, los mismos que serán abundantes siempre y cuando el bovino reciba una dieta proporcionada y bien balanceada. La norma NTE INEN 9 permite un mínimo de 8,2% de sólidos no grasos, por lo que los resultados obtenidos durante el presente estudio cumplen con este requisito porque presentan valores de 8.51%, 8.58% y 8.67% para los centros CA 1, CA 2 y CA 3, respectivamente. Comparando estos valores con el estudio de parámetros composicionales y nutricionales entre diferentes especies de mamíferos productores de leche en Antioquia Colombia, observamos que los valores de sólidos no grasos de la leche cruda (8.30 ± 0.11) se asemejan al presente estudio (Ocampo et al., 2016, pp. 177-186).

El punto de congelación o punto crioscópico permite detectar el suero añadido, ya que a medida que se añade agua a la leche, el punto crioscópico tiende a estar más cercano a cero (López y Barriga, 2016, p. 10). Según, la NTE INEN 9 oscila entre -0.536 y -0.512, el mismo que determina la temperatura a la cual la sustancia pasa a estado sólido. Los resultados muestran un valor de -0.532 para CA 1, -0.55 para CA 2 y -0,56 para CA 3, en donde el único que se encuentra dentro de los rangos permitidos es el centro de acopio CA 1. El descenso del punto crioscópico se debe principalmente a la lactosa y sales minerales que se encuentra en solución y cuando se le añade agua a la leche cruda los solutos tienden a disminuir y el punto de congelación aumenta acercándose al del agua Ochoa (2016, pp. 44-45).

En un estudio similar, realizado en la Provincia de Zamora Chinchipe, evaluaron la calidad fisicoquímica de la leche cruda mediante el uso del equipo Lactoscan en donde se obtuvieron valores de grasa, SNG, densidad, punto crioscópico y pH de 3.59%, 7.82%, 1.030, -0.503 y 6,64, respectivamente. Estos valores son diferentes a los hallados en el presente estudio, lo que puede deberse a varios factores entre ellos la raza del animal, la alimentación, las condiciones ambientales y si la leche ha sufrido adulteración o alteración (Ambuludí et al., 2017, pp. 31 - 38).

Las pruebas de antibióticos y peróxidos de los tres centros de acopio resultaron negativas, cumpliendo con lo establecido en la NTE INEN 9. Cabe recalcar que en caso de que estos parámetros resulten positivos se debe seguir un protocolo para la destrucción de la leche, debido a que el consumo de leche con residuos de antibióticos resulta tóxico para la salud llegando a afectar a órganos importantes como los riñones, hígado, médula, sangre, destrucción de la flora bacteriana, reducción de la síntesis de vitaminas y por último provocando reacciones alérgicas graves (Ochoa, 2016, pp. 44-45). La prueba de cloruros se realizó mediante tirillas reactivas, que ofrecen resultados en segundos. Según Chen et al (2018, p. 8) la prueba de cloruros debe encontrarse dentro de un rango máximo de 1g/L por lo que todos los centros de acopio cumplen con este parámetro, ya que todos presentan un valor de 1000ppm.

Jurado et al. (2019, pp. 53-59) realizaron estudios similares de antibióticos y peróxidos mediante pruebas rápidas y cloruros según el protocolo de la casa comercial Centro Agro Lechero. Se tomaron muestras de leche por duplicado cada 10 días a siete vacas lecheras durante su segundo tercio de lactancia, en donde el 100% de las muestras resultaron negativas para antibióticos y peróxidos; mientras que la prueba de cloruros resultó positiva.

Con base en los resultados de los análisis que se evalúan directa e indirectamente a los macro componentes de la leche se podría indicar que a la leche recibida en los centros de acopio estudiados no le añaden componentes que alteren su composición química.

En cuanto al pH los valores fueron: CA 1 presenta pH =7.13, CA 2 pH =7.08 y CA 3 pH =6.96, por lo que se observa que estos valores se encuentran fuera de los límites permisibles de acuerdo al Manual de Agrocalidad para Centros de Acopio que indica que la leche cruda debe encontrarse en rangos de pH que oscilan entre 6.5 y 6.8. El valor del pH por debajo de lo normal está asociado al calostro o a contaminación microbiológica, ya que las bacterias transforman la lactosa en ácido láctico; mientras que por encima de lo normal es indicativo de mastitis cuando el pH se encuentra de 6.9 a 7.5; aunque también este incremento se ha visto relacionado con el periodo de lactancia o la adición de un compuesto que neutralice el pH de la leche (López y Barriga, 2016, p. 10), esto sugiere que la leche que se evaluó en los centros de acopio pudiese estar adulterada con un neutralizante que no se refleja en las pruebas indicadas anteriormente.

3.5. Análisis microbiológico

El análisis microbiológico ayuda a mantener bajo control la proliferación de virus, bacterias, microorganismos que pueden causar contaminación, intoxicación y enfermedades (Bayona, 2009,

p. 11).Este análisis se desarrolla debido a que la leche es considerada un alimento fundamental en la dieta, además es la materia prima de diversos productos como yogurt, queso, bebida láctea.

Tabla 6-3:Resultados del análisis microbiológico de la leche cruda de cada centro de acopio en Log₁₀ UFC/g

Microorganismo	Referencia	Semana 1			Semana 2			Semana 3		
		CA1	CA 2	CA 3	CA 1	CA 2	CA 3	CA 1	CA 2	CA 3
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 a 4 ***	5,78±0,22	6,16±0,03	5,19±0,25	5,43±0,33	5,03±0,06	5,40±0,01	5,74±0,12	4,89±0,13	6,46±0,02
<i>Enterobacterias</i>	5,11**	7,87 ± 0,65	7,21± 0,14	8,41±0,14	6,88±0,02	6,55±0,01	7,32±0,14	5,86±0,08	6,35±0,16	6,01±0,16
<i>Lactobacilos</i>	No aplica	6,40±0,10	6,42 ± 0,03	5,01±0,02	6,38±0,02	5,91±0,13	5,33±0,04	5,61±0,19	6,54±0,02	7,49±0,02
<i>Streptococos lácticos</i>	No aplica	6,46 ± 0,02	6,13±0,16	6,08±0,15	7,16±0,05	6,99±0,02	6,43±0,01	5,95±0,02	6,59±0,04	7,46±0,10
<i>Aerobios mesófilos</i>	6,18*	7,20± 0,02	7,18±0,27	6,55±0,05	7,80±0,15	7,52±0,01	7,75±0,04	8,07±0,21	7,27±0,19	7,59±0,04
Mohos y levaduras	4,48**	5,79 ± 0,09	6,94±0,19	6,86±0,08	5,05±0,24	4,86±0,07	4,76±0,09	4,98±0,10	4,76±0,14	4,83±0,14

*NTE INEN 9. Requisitos leche cruda; **Mallet et al. 2012; ***Titouche, et al. 2016

Realizado por: Llumán, Priscila; Ramírez, Melissa, 2020

En la Tabla 7-3 se observa los datos obtenidos del análisis microbiológico en el cual, se evidencian valores que sobrepasan los máximos permitidos encontrados en bibliografía.

Existe una fluctuación del número de microorganismos en cada semana en cada centro de acopio lo que puede deberse a la variación en cuanto a los proveedores que entregan la leche al centro, ya que son socios del centro más no son obligados a entregar el producto todos los días.

Los valores elevados pueden deberse a dos vías de contaminación: la vía mamaria, ya que los microorganismos alcanzan la ubre contaminando la leche antes y después del ordeño, estos son capaces de entrar a través del esfínter del pezón; por el medio externo al manipular las mamas con manos contaminadas (Brousett et al. 2015, p.172).

Las características microbiológicas globales han demostrado que las muestras de leche recolectadas en los tres centros de acopio de la provincia de Chimborazo podrían ser una fuente importante de infección con una amplia gama de microorganismos, particularmente patógenos entéricos presentes. La mayor fuente de contaminación microbiana de la leche fue la presencia de Enterobacterias seguidas por *Aerobios mesófilos*, *Staphylococcus aureus*, Mohos y levaduras. Está contaminación surge probablemente del estiércol o animales enfermos, aunque también puede deberse a las incorrectas prácticas de higiene y saneamiento que se llevan a cabo en el centro. (Fatouma et al. 2017, p.4)

- ***Recuento de Staphylococcus aureus***

El número de *S. aureus* supera los valores permisibles en gran medida, como se puede observar en la Tabla 7-3, los valores son mayores en el centro de acopio de CA 1 seguidos por CA 3 y CA 2.

En cuanto al centro de acopio CA 1 en la segunda semana se observa un valor menor en el recuento, lo que puede deberse al cambio de operario que manipulo la leche en esa semana ya que presentaba mayor cuidado en el manejo de los instrumentos de medición y la exposición de la leche al ambiente

En el estudio realizado por Fagundes et al (2010, p. 378) se observan valores elevados de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche cruda en Brasil. Sin embargo, es difícil comparar los resultados del presente estudio y los reportados por otros autores, porque la aparición de *S. aureus* varía según el área, las prácticas de manipulación de los animales y las condiciones higiénicas durante ordeño, entre otros factores.

S. aureus es considerado como la tercera causa más importante de enfermedad en el mundo entre las enfermedades transmitidas por alimentos reportadas, debido a su capacidad para producir una amplia gama de enterotoxinas estables al calor. *S. aureus* puede acceder a la leche ya sea por excreción directa de leche de ubres con mastitis estafilocócica clínica o subclínica o por contaminación del medio ambiente durante el manejo y procesamiento de leche cruda (Rahman et al. 2015, p.33)

- ***Recuento de Enterobacterias***

En la tabla 7-3 se encuentran los valores del número de enterobacterias presentes en la leche cruda, en la que se observa que el valor más alto se presentó en la tercera semana en el centro de acopio CA 1 ($8,41 \pm 0,14$), el menor valor se encontró en la primera semana del centro de la CA 2 ($5,86 \pm 0,08$).

La presencia de un gran número de enterobacterias en la leche, se asocia principalmente con la ubre sucia y las tetinas, lo que se debe a una variedad de fuentes como el estiércol, el suelo, los alimentos, el personal e incluso el agua, proporciona un índice de estándar de higiene utilizado en la producción de leche (Fatouma et al. 2017, p.4).

Belkot et al (2014, p. 3) en su estudio “Calidad microbiológica de la leche vendida directamente de los productores a los consumidores” analizaron 248 muestras de leche cruda (cada muestra de una granja diferente) recolectadas en 16 distritos administrativos de Pensilvania mostraron la presencia de *Campylobacter jejuni* (2% de las muestras), *E. coli* productora de toxina Shiga (2.4%), *L. monocytogenes* (2.8%), *Salmonella* (6%) y *Yersinia enterocolitica* (1,2%). En total, el 13% de las muestras estaban contaminadas con una o más especies de microorganismos patógenos. Como se observa en el estudio la presencia de enterobacterias es alta, lo que guarda relación con la presente determinación.

El aumento de la cantidad de Enterobacterias totales puede provocar intoxicaciones alimentarias. Los conteos esporádicos de coliformes altos también pueden ser una consecuencia de mastitis coliforme no reconocida, causada principalmente por *E. coli*. La detección de *E. coli* en la leche a menudo refleja la contaminación fecal y es el agente causal conocido de la diarrea y otras enfermedades relacionadas con los alimentos contaminados a través de su ingestión (Fatouma et al. 2017, p.4).

- ***Recuento de Aerobios mesófilos***

El conteo de aerobios mesófilos es un buen indicador de la higiene general, permitiendo la apreciación de la contaminación microbiana general y de la calidad del producto. Una alta contaminación en muestras de leche cruda es indicativo de que se produjo una higiene insuficiente en el ordeño o infección por la piel de animales, manos de ordeñadores, cobertizo de animales y utensilios de ordeño (Fatouma et al. 2017, p.3).

Como se observa en la tabla 7-3 el número de aerobios mesófilos en todos los centros supera el máximo permitido establecido en la norma INEN 9. El centro de acopio con un promedio de microorganismos mayor es la CA 2 a pesar que en la primera semana en CA 3 el valor fue de $8,07 \pm 0,21$.

Resultados similares se encontraron en el estudio realizado por Brousett et al (2015, p.172) donde el valor de referencia fue de 6 Log₁₀ UFC/g observándose que en dos localidades los datos fueron de 7,33 y 7,16 superando lo permitido. Junghyun(2013, p. 170) comparo las placas de cultivo medio seco para bacterias mesófilas aerobias en productos de filete de leche, helado, jamón y bacalao, obteniendo un valor de 6.30 ± 3.04 para la leche. Cabeli et al (2018, p.38) obtuvo un valor de 6.30 para aeróbios mesófilos en leche cruda. Todos los datos determinados se encuentran por encima de los límites permisibles lo indica una incorrecta manipulación de la materia prima tanto en las etapas de ordeño y post-ordeño, por lo que se deben mejorar los procedimientos llevados a cabo en dichas etapas

- ***Recuento de Mohos y Levaduras***

El centro de acopio con mayor número de mohos y levaduras fue CA 1 con un valor de $6,53 \pm 0,64$ valor que se encuentra alejado del máximo permitido (4,48), por el contrario, el centro CA 2 ($4,89 \pm 0,15$) y de C3 ($4,86 \pm 0,11$) presentan valores similares y cercanos al límite. El mayor valor en CA 1 puede deberse a la incorrecta manipulación de los instrumentos de medición del volumen, ya que en el caso del decalitro se coloca en el suelo provocando una transferencia de microorganismos del suelo a la leche. Además, en este centro la leche presenta mayor exposición al ambiente.

Como se observa en el estudio realizado por Fleet & Mian (1987, p. 146) el análisis de 161 muestras de leche arrojó valores elevados de poblaciones de mohos y levadura (hasta 6 y 7 Log₁₀ UFC/g). Valores que se superan en gran medida a los encontrados en este estudio.

Estos microorganismos son capaces de sobrevivir y multiplicarse a temperaturas de refrigeración y pueden causar enfermedades graves. Son sugestivos de la presencia de animales con mastitis. Ya que son patógenos asociados a la mastitis, típicamente infecta el canal de la tetina y pasa a la leche durante el ordeño (Rahman et al. 2015, p.35).

- ***Bacterias Ácido lácticas***

Hurtado (2017, p. 50) en su estudio determinó el número de bacterias ácido lácticas presentes en la leche obteniendo un valor de $6,9 \pm 0,01$. Zapata et al (2012, p.277) en su cuantificación obtuvo un valor de 6,40. Estos valores se asemejan a los que se encontraron en el presente estudio.

A. Recuento de Lactobacillus

Estos microorganismos no son considerados patógenos, ya que forman parte de la microbiota del animal. Tienen propiedades antibióticas, ya que inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos, propiedad que se relaciona principalmente con la producción de metabolitos primarios y secundarios tales como ácidos láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetil, etanol, antibióticos y compuestos fenólicos (Días et al. 2018, p. 2). Cabe mencionar que el olor característico de estas bacterias es debido al ácido láctico que produce.

En la tabla 7-3 se evidencia que C3, en la tercera semana se presenta el mayor valor de estos microorganismos con un valor de $7,49 \pm 0,02$. En cuanto al promedio de C3 presentó el mayor valor en comparación con los otros dos centros.

B. Recuento de Streptococos lácticos

Con un valor mayor de estreptococos lácticos se encuentra el centro CA 2 seguido por CA 3 y CA 1 como se evidencia en la tabla 7-3 los valores no presentan gran variación.

Estos microorganismos y los anteriores, son considerados de gran importancia en el área de alimentos ya que mediante diversas rutas metabólicas consiguen diferentes productos como ácido cítrico, ácido propiónico, endulzantes no calóricos, bacteriocinas etc.; otorgando valor a los productos en cuanto a sus propiedades organolépticas, terapéuticas y valor nutricional (Parra. 2010, p.102).

3.6. Identificación de microorganismos

Las pruebas bioquímicas se realizaron para lograr identificar dos cepas de la familia *Enterobacteriaceae*, las cuales se corresponden a las especies *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* inactivo para RC y RF, respectivamente. La presencia de las enterobacterias se

asocia al déficit de condiciones higiénico sanitarias, por lo que es probable que la leche cruda se encuentre contaminada por estiércol, o bien el suelo y agua con que se suele lavar los instrumentos para el ordeño se encuentren contaminados.

Tabla 7-3: Resultados de las pruebas bioquímicas

	Kligler				Citrato	Indol	Movilidad	Ureasa	Identificación
	Glucosa	Gas/glucosa	Lactosa	SH ₂					
RC	+	+	+	-	+	-	-	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
RF	+	-	V ⁻	-	-	+	-	-	<i>Escherichia coli</i> inactivo

Fuente: Álvarez et al., 1996.

Realizado por: Llumán, Priscila; Ramírez, Melissa, 2020

Klebsiella pneumoniae es un microorganismo importante debido a su capacidad de producir mastitis clínicas hiperagudas, lo que conlleva muchas veces a la muerte del bovino o a una disminución de producción láctea. A partir del estiércol del animal, todo es más susceptible a contaminarse con *Klebsiella* ya sea el suelo, agua, las ubres y patas del bovino. La Doctora Zadoks (2015, pp. 1-3) quien es investigadora de la Universidad de Cornell en Ithaca, New York y es directora del Departamento de Biología Molecular del Quality Milk Production Services (QMPS), mediante investigaciones en diferentes muestreos de suelos, patas, camas y pezones observa que el 90% de muestras positivas para *Klebsiella* son muestras recogidas en el suelo por donde transitan los bovinos, un 60% de las muestras tomadas de las patas de los animales contenían *Klebsiella* y un 41% de las muestras de las ubres se encontraban infectadas por este microorganismo; aunque en otros nuestros se encontró que el 100% de las ubres antes del ordeño contenían *Klebsiella*, lo que se reducía hasta un 34% tras la ejecución de un lavado y desinfectado adecuado.

Escherichia coli inactivo es un bacilo Gram negativo, que se encuentra generalmente en la parte inferior del intestino de los organismos de sangre caliente. Presenta lactosa positiva, por lo que en Agar MacConkey se observaron colonias rosadas, además en agar eosina azul de metileno (EMB) se presentaron colonias verdes brillantes color característico de este microorganismo debido a la rápida fermentación de la lactosa (BD, 2013, p. 1).

Según Msalale (2017) los aislamientos de este tipo de microorganismo se pueden confirmar bioquímicamente mediante el uso de un método tradicional llamado pruebas IMViC. Este en un conjunto de cuatro pruebas: indol, citrato, rojo de metilo y voges-proskauer, los cuales sirven para diferenciar a los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Los resultados que se

obtuvieron en este caso fueron citrato negativo e indol positivo, los cuales guardan relación con los obtenidos en la tabla 8-3

Tal y como se menciona en Herrera et al (2001, p. 1) la información en literatura acerca de *Escherichia coli* inactivo es mínima por lo que resulta complicado conocer la verdadera patogenia que presenta el microorganismo, así como sus características metabólicas.

CONCLUSIONES

- La valoración llevada a cabo mediante la aplicación de la lista de chequeo presentó un alto porcentaje de no cumplimiento en cuanto a los centros de acopio, ya que presentan falencias en infraestructura e higiene, tanto de los instrumentos de manejo como del lugar de recepción y análisis de muestras. El transporte de los proveedores presenta bajos porcentajes de cumplimiento en el uso y aseo adecuado de los bidones. Por lo tanto, estas condiciones se consideran como potenciales fuentes de contaminación. En lo que concierne al transporte del tanquero este cumple con los requisitos expuestos en la lista de chequeo.
- Se evaluó la calidad fisicoquímica de las muestras de leche cruda procedentes de tres centros de acopio mediante el Lactoscan y pruebas rápidas de diagnóstico, en donde se pudo evidenciar que la grasa, densidad, sólidos totales y antibióticos se encuentran dentro de los rangos permitidos por la NTE INEN 9. Requisitos de leche cruda, mientras que el punto de congelación y pH no se encuentran dentro de los rangos permitidos. En cuanto a cloruros y peróxidos se encontraban dentro de los rangos permisibles.
- El presente estudio destacó la pobre calidad microbiológica de la leche cruda recolectada en los tres centros de acopio, lo que es evidente por el elevado número de aeróbios mesófilos, enterobacterias, *Staphylococcus aureus* y mohos y levaduras en las muestras y, por lo tanto, ponen en peligro la calidad y seguridad de la leche cruda y por ende la salud del consumidor. Además, este resultado sugiere la necesidad de mejorar las condiciones higiénicas y las medidas sanitarias adecuadas.
- El aislamiento e identificación de los microorganismos dio como resultado la presencia de dos cepas de la familia *Enterobacteriaceae*, las cuales se corresponden a las especies *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* inactivo, considerados microorganismos patógenos, causantes de enfermedades infecciosas graves.

RECOMENDACIONES

- Se requiere más investigación del estado de salud de los animales, especialmente lo relacionado a la mastitis y la importancia del efecto de los contenedores para determinar su contribución a la calidad microbiana.
- Se recomienda encarecidamente no consumir leche cruda.
- Se debe proporcionar información sobre seguridad alimentaria a productores, manipuladores y consumidores
- Socializar los resultados en los tres centros de acopio de leche cruda para que promueva el mejoramiento de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

ABDOUL LATIF, F.; et.al. “Evaluation of Microbiological Quality of Raw Milk from Farmers and Dairy Producers in Six Districts of Djibouti”. *J Food Microbiol Saf Hyg.* [en línea], 2017, (Djibout) 2 (3), pp. 1-7. [Consulta: 06 de enero de 2020]. ISSN:2476-2059. Disponible en: <https://www.longdom.org/open-access/evaluation-of-microbiological-quality-of-raw-milk-from-farmers-and-dairyproducers-in-six-districts-of-djibouti-2476-2059-1000124.pdf>

ACOSTA, N. Identificación de riesgos químicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia [en línea], 2011, (Colombia), pp. 1-93. [Consulta: 03 octubre 2019] ISSN 9789581301522. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-peligros-biologicos-en-leche.pdf> [http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/investigacion/ueria/Publicaciones/ER PELIGROS BIOLOGICOS EN LECHE.pdf](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/investigacion/ueria/Publicaciones/ER_PELIGROS_BIOLOGICOS_EN_LECHE.pdf) <https://www.minsalud.gov.co/site>.

AGROCALIDAD. Manual De Procedimientos Para La Vigilancia Y Control De La Inocuidad De Leche Cruda (Agrocalidad). [en línea], 2012, (Ecuador) pp. 1-120. [Consulta: 15 mayo 2019] Disponible en: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/inocuidad/Manual de Leche DAJ-2013461-0201.0213.pdf>.

ÁLVAREZ, M.; et.al. *Manual De Técnicas de en Microbiología Clínica.* Quito – Ecuador: Graficart, 1996. pp. 1-290

AMBULUDÍ, J.; et.al “Control de calidad de leche cruda en la parroquia Zumbi, provincia de Zamora Chinchipe”. *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara.* [en línea], 2017, (Venezuela) 13(1), pp. 1-38. [Consulta: 09 enero 2020]. ISSN 2244 – 7733. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Nohemi_Jumbo_Benitez/publication/333856444_Control_de_calidad_de_leche_cruda_en_la_parroquia_Zumbi_provincia_de_Zamora_Chinchipe/links/5d09491f458515ea1a709e57/Control-de-calidad-de-leche-cruda-en-la-parroquia-Zumbi-provincia-de-Zamora-Chinchipe.pdf#page=31.

ANMAT. Enfermedades transmitidas por alimentos [blog]. Argentina, 2017 [Consulta: 10 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Enfermedades%20transmitidas%20por%20alimentos.pdf>

ARCOSA. Prácticas correctas de Higiene PCH [blog]. Ecuador, 2018 [Consulta: 10 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.controlsanitario.gob.ec/practicas-correctas-de-higiene-pch/>

ARENAS SUESCÚN, C.; ZAPATA FERNANDEZ, R.; & GUTIÉRREZ CORTÉS, C. “Evaluación de la fermentación láctica de leche con adición de quinua (*Chenopodium quinoa*)” *Vitae* [en línea] 2012, (Colombia) 19 (1), pp. 276-278. [Consulta: 07 de enero de 2020]. Disponible en: https://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914084.pdf?fbclid=IwAR2Diofxyu_Utd84gHukQVwJkN2WM9LSWhWbe5jNwJ0swozFg3gn6T7Ub0

ARGUELLO, P. Guía de laboratorio de bromatología II. Ecuador, 2017 [Consulta: 11 de mayo de 2019]

BAYONA, M. “Evaluación microbiológica de alimentos adquiridos en la vía pública en un sector del norte de Bogotá”. *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* [en línea], 2009, (Colombia) 12 (2), pp. 9-17 [Consulta: 06 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v12n2/v12n2a02.pdf>

BCCAMPUS OPEN EDUCATION. Causas de enfermedades transmitidas por los alimentos [blog]. 2018 [Consulta: 10 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://opentextbc.ca/foodsafety/chapter/causes-of-foodborne-illnesses/BD>. “BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified”. [En línea] 2013 [Consulta: 10 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8765>

BOU, G.; et.al. “Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología”. *ELSEVIER* [en línea], 2011, (España) 29 (8) pp. 601-608. [Consulta: 10 de julio de 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-metodos-identificacion-bacteriana-el-laboratorio-S0213005X11001571>

BELKOT, B.; et.al. “Microbiological quality of milk sold directly from producers to consumers”. *Dairy Science* [en línea], 2015, 98 (7), pp. 4294-4301. [Consulta: 06 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030215002994>

BROUSETT MINAYA, M.; et.al.; “Calidad fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de leche cruda en las cuencas ganaderas de la región Puno –Perú”. *Scientia Agropecuaria* [en

[línea], 2015, (Perú) 6 (3), pp. 165-176. [Consulta: 07 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v6n3/a03v6n3.pdf>

BUÑAY BARAHONA, Narda Catalina; & PERALTA VÁSQUEZ, Fernanda Katherine. Determinación del recuento de aerobios mesófilos en leche cruda que industria a industrias lactochoa-Fernandez CIA. LTDA” [en línea] (Trabajo de titulación). (Maestría). Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador. 20015. pp. 1-101. [Consulta: 12 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/21584/1/TESIS.pdf>

CABELI, P.; et.al. “Determination of Aerobic Mesophilic Bacteria and Coliforms in Raw Milk in the Region of Kosovo” *Albanian j. agric. sci.* [en línea], 2018 (Albania) 17(1), pp. 37-40 [Consulta: 06 de enero de 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/324909866_Determination_of_Aerobic_Mesophilic_Bacteria_and_Coliforms_in_Raw_Milk_in_the_Region_of_Kosovo?fbclid=IwAR1r3gxAH44bH0vCGh74r7F7ZmPXZFKJtUJp1qkVPRV3deAGVZbktGTjd-Q

CALDERÓN, A.; et.al. Indicators of raw milk quality in different regions of colombia. [en línea], 2006, (Colombia) 11(1), pp. 725-737. [Consulta 10 enero 2020]. ISSN 725-737 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262709685_INDICATORS_OF_RAW_MILK_QUALITY_IN_DIFFERENT_REGIONS_OF_COLOMBIA

CALDERÓN, R.; et.al. “Determination of adulterants in stockpiled crude milks from cheese processors in Montería (Córdoba)”. *Scientific Electronic Library Online.* [en línea], 2013, (Córdoba) 17(2), pp. 202-206. [Consulta 29 diciembre 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v17n2/v17n2a07.pdf>.

CENTRO DE LA INDUSTRIA LÁCTEA. La Leche del Ecuador. [en línea], 2015, (Ecuador) pp. 1 -199. [Consulta 04 abril 2019]. Disponible en: https://www.cilecuador.org/descargas/LA_LECHE_DEL_ECUADOR.pdf.

XINGGUANG, C.; et.al. “Determination of chlorine ions in raw milk by pulsed amperometric detection in a flow injection system” *American Dairy Science Association* [en línea], 2018, (China) 101 (11). pp. 1-12. [Consulta: 08 de enero de 2020]. Disponible en: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218307586

CODEX STAN 206. *Norma General del Codex para Uso De Términos Lecheros*

COELLO, Cristina. *Ecuador gasta 82 millones en tratamiento de enfermedades transmitidas por alimentos.* [blog]. Quito-Ecuador. Edición Médica, 5 de diciembre, 2018 [Consulta: 4 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.edicionmedica.ec/secciones/salud-publica/ecuador-gasta-82-millones-de-dolares-en-el-tratamiento-de-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-93290f>

CONTROL SANITARIO. Normativa Técnica Sanitaria Sobre Prácticas Correctivas De Higiene. Ecuador, 2015 [Consulta: 10 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2016/02/NORMATIVA-TECNICA-SANITARIA.pdf>

CROW, R. Income Models for Open Access: an Overview of Current Practice [en línea]. Washington-USA: Scholarly Publishing & Academic Resources Coalition, Inglaterra: INTECH, 2017 OPEN. [Consulta: 20 septiembre 2009]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/318399511_Isolation_and_Characterization_of_Escherichia_coli_from_Animals_Humans_and_Environment

DEPARTAMENTO DE SALUD DE MINESOTA. *Causas y síntomas de enfermedades transmitidas por alimentos* [blog]. Minesota-USA, 2016. [Consulta: 10 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.health.state.mn.us/diseases/foodborne/basics.html>

DIAS, J.; et.al. “Acid Lactic Bacteria as a Bio-Preservant for Grape Pomace Beverage” Front. Sustain. Food Syst [en línea] 2018, (USA) 2(58). pp. 1-8. [Consulta: 07 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2018.00058/full>

ESPINOZA BUESTÁN, Simón Bolívar. Análisis microbiológico de coliformes totales y fecales en la leche cruda de la parroquia baños, en el período agosto-septiembre del 2014. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tercer Nivel). Universidad Católica de Cuenca. Cuenca, Ecuador. 2015. pp. 1-102. [Consulta: 10 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://dspace.ucacue.edu.ec/bitstream/reducacue/6603/1/An%C3%A1lisis%20microbiol%C3%B3gico%20de%20coliformes%20totales%20y%20fecales%20en%20la%20leche%20cruda%20de%20la%20parroquia%20Ba%C3%B1os,%20en%20el%20per%C3%ADodo%20agosto%20-%20septiembre%20del%202014.pdf>

FAGUNDES, H.; et.al. “Occurrence of staphylococcus aureus in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil” Brasileña de Microbiología. [en línea], 2010, (Brasil) 41 (2),

pp.376-380. [Consulta: 06 de enero de 2020]. ISSN 1517-8382. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v41n2/v41n2a18.pdf>

FAO. Presentación y evaluación de los datos sobre residuos de plaguicidas para la estimación de los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. [en línea]. 2017. pp. 1-305. [Consulta 10 mayo 2019]. ISSN 1014-1227. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5452s.pdf>.

FDA. Los peligros de la leche cruda. [en línea], 2012, pp. 1-2. [Consulta 16 abril 2019] Disponible en: <https://www.fda.gov/media/84522/download>.

FDA. Hechos sobre alimentos. [en línea], 2018, pp. 1-4. [Consulta 16 abril 2019]. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/119384/download>.

FERNÁNDEZ, E.; et.al. “Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche”. Scientific Electronic Library Online [en línea], 2015, (Madrid) 31(1), pp. 92-101. [Consulta 10 septiembre 2019]. ISSN 0212 - 1611. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v31n1/09revision09.pdf>.

FIENCO BACUSOY, Dolores Estefanía. Evaluación del proceso sanitario del ordeño y control de calidad de la leche cruda procedente de los centros de acopio de las parroquias El Chaupi y El Pedregal pertenecientes al Cantón Mejía que proveen a la empresa El Ordeño [en línea] (Trabajo de titulación). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador. 2013. pp. 5-10. [Consulta 2019-12-01]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4363/1/T-UCE-0008-17.pdf>.

FLEET, G.; & MIAN, M. “The occurrence and growth of yeasts in dairy products” Food Microbiology, [en línea], 1987 4 (2), pp. 145-155 [Consulta: 06 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0168160587900213>

FREIRE, W.; et.al. Encuesta Nacional De Salud Y Nutrición, ENSANUT [en línea], 2012, pp. 7-11. [Consulta 05 noviembre 2019] Disponible en: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Estadisticas_Sociales/ENSANUT/MS_P_ENSANUT-ECU_06-10-2014.pdf.

GARCÍA MARTINEZ, E.; et.al. Determinación de la calidad higiénica de la leche mediante la medición indirecta del tiempo de reducción del azul de metileno o prueba de la reductasa

microbiana. [En línea] Valencia [Consulta: 11 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/38380/Eva%20Garc%C3%ADa.%20Calidad%20leche-2014.pdf>

GONZÁLEZ, G.; et.al. Primer Foro sobre Ganadería Lechera de la Zona Alta de Veracruz. [en línea], 2010, pp. 1-7. [Consulta 12 septiembre 2019] Disponible en: https://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/CALIDADDELALECHERUDA.pdf.

HERRERA, M.; et.al. “Aislamiento de cepas de Escherichia spp. diferentes de Escherichia coli en el Hospital Nacional de Niños de 1995 a 2000” Rev. méd. Hosp. Nac. Niños [en línea] 2001, (Costa Rica) 36 (1-2). pp. 1-3 [Consulta: 10 de enero de 2020]. ISSN 1017-8546 Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462001000100006

HURTADO GOMEZ, Abad. Cuantificación de bacterias ácido lácticas por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en la fermentación controlada de Capsicum frutescens, ají “charapita” [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 2017. Pp. 1-77 [Consulta: 06 de enero de 2020]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/6761/Hurtado_ga.pdf?sequence=1&isAllowed=y&fbclid=IwAR0qkndQywiFcU593ErY6oK007w3lxXDndPPg4ef5d6uDi0GfrsT4cyhFs

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Identificación De Riesgos Químicos Asociados Al Consumo De Leche Cruda Bovina En Colombia [en línea], 2010, pp. 17 – 18. [Consulta 15 septiembre 2019] Disponible en: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Publicaciones%20ERIA%20y%20Plaguicidas/ER%20PELIGROS%20QUIMICOS%20EN%20LECHE.pdf>

JUNGHYUN, P.; & KIM, M. Comparación de placas de cultivo medio seco para bacterias mesófilas aerobias en productos de filete de leche, helado, jamón y bacalao. Prev Nutr Food Sci [en línea], 2013, 18 (4), pp. 269–272. [Consulta: 06 de enero de 2020]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3925217/?fbclid=IwAR21hXzS8ELwV-pQl8jqsDPOAPtL_Bi0V4BQuGoJscXEj-EP8bhuyklejM

JURADO, H.;et.al“Evaluation of the compositional, microbiological and sanitary quality of raw milk in the second third of lactation”. Scientific Electronic Library Online [en línea], 2019,

(Colombia) 66(1) pp. 53-59 [Consulta 02 enero 2020]. ISSN 10.15446. Disponible en: <http://www.scielo.org/pdf/rfmvz/v66n1/0120-2952-rfmvz-66-01-53.pdf>.

KOPPER, G.: et al. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. [en línea]. 2009, pp. 13-28. [Consulta 10 diciembre 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>

LÓPEZ, Á.; & BARRIGA, D. La leche composición y características. [en línea]. 2016, pp 5-20. [Consulta 10 diciembre 2019]. Disponible en: www.juntadeandalucia.es

LÓPEZ RAMÍREZ, C.; & VÉLEZ RUIZ, J. “Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra” Información Tecnológica. [En línea] 2016, (México) 27(6). pp. 115-128. [Consulta: 08 de enero de 2020]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v27n6/art12.pdf>

LOZANO, M. y ARIAS, D. “Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia”. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias [en línea], 2008, (Colombia) 21(1), pp. 128-135 [Consulta 10 diciembre 2019]. ISSN 0120-0690. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v21n1/v21n1a12.pdf>.

MALLET, A.; et. al. “Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices” International Dairy Journal [en línea], 2012, (Francia) 27, pp.13-21. [Consulta: 07 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694612001586>

MARISCAL, P.;et.al. “Características microbiológicas de leche cruda de vaca en mercados de abasto de trinidad, Bolivia”. Agrocencias Amazonía [en línea],2013, (Bolivia) 1(2), pp. 18-24. [Consulta: 11 de mayo de 2019] Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2307-96062013000200002&lng=es&nrm=iso

MARTÍNEZ VASALLO, A.; et.al.“Calidad e inocuidad de la leche cruda en las condiciones actuales de Cuba”. Salud Animal [en línea], 2017, (Cuba) 39 (1), pp. 51-61. [Consulta: 11 de mayo de 2019]. ISSN 2224-4697. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v39n1/rsa07117.pdf>

MSALALE LUPINDU, A. “Isolation and Characterization of Escherichia coli from Animals, Humans, and Environment” [en línea]. 2017. [Consulta: 10 de enero de 2020]. Disponible en:

<https://www.intechopen.com/books/-i-escherichia-coli-i-recent-advances-on-physiology-pathogenesis-and-biotechnological-applications/isolation-and-characterization-of-i-escherichia-coli-i-from-animals-humans-and-environment>

NTE INEN 0004:1984. *Leche y productos lácteos. Muestreo.*

NTE INEN 9: 2012. *Requisitos de leche cruda*

NTE INEN 15, 1973. *Leche. Determinación Del Punto De Congelación*

NTE INEN 1529-1:2013. *Control Microbiológico de los Alimentos*

NTE INEN 1529-2:1999. *Control microbiológico de los alimentos*

OCAMPO, R.: et.al. “Estudio comparativo de parámetros composicionales y nutricionales en leche de vaca, cabra y búfala, Antioquia”. Revista Colombiana de Ciencia Animal [en línea], 2016, (Colombia) 8(2), pp. 177-184. [Consulta 15 septiembre 2019] ISSN 2027-4297 Disponible en: http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/11038/1/OcampoRicardo_2016_LecheVacaBufalaCabra.pdf.

OCHOA, B. Detección De Residuos De Antibióticos En Leche Cruda Fluida En La Parroquia Chicaña Del Cantón Yantzaza De La Provincia De Zamora Chinchipe. [en línea] (Trabajo de titulación) Universidad Nacional de Loja, Ecuador. 2016. pp. 44-45. [Consulta 2020-01-01] Disponible en: https://dspace.unl.edu.ec/bitstream/123456789/17157/1/Byron_Fabián_Ochoa_Trelles.pdf.

PARRA HUERTAS, R. “Bacterias Ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos” Facultad de Ciencias Agropecuarias [en línea], 2010, (Colombia) 8 (1). pp. 93-105. [Consulta: 08 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>

PILAMUNGA ANDRADE, Cristina Alexandra. Evaluación higiénico – sanitaria de la quesera artesanal cod.q 1 ubicada en la parroquia Químiag del cantón Riobamba, provincia de Chimborazo. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tercer nivel). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. 2017. 1-106. [Consulta: 27 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6937/1/56T00739.pdf>

RAHMAN, T.; et.al. “Microbiological analysis of raw milk, pasteurized milk and yogurt samples collected from different areas of Dhaka city, Bangladesh” Journal of Bangladesh

Academy of Sciences [en línea], 2015 (Bangladesh) 39 (1), pp. 31-36. [Consulta: 06 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.banglajol.info/index.php/JBAS/article/view/23655>

RODRÍGUEZ, H.; et.al. “Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio”. Revista Electrónica de Veterinaria [en línea], 2015, (España) 16(8), pp. 3-8. [Consulta 07 diciembre 2019]. ISSN 1695-7504. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63641401002.pdf>.

SANDLE, T. Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control. [En línea]. Woodhead Publishing, 2016. [Consulta: 10 de julio de 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/book/9780081000229/pharmaceutical-microbiology#book-info>

SANTIAGO, F. Determinación de proteínas por el método Kjeldahl [blog]. España:2011 [Consulta: 11 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://grupo-selecta.com/catalogo-2019/es/10-aparatos-para-analisis-alimentarios-y-aguas.pdf>

SEDESOL. Políticas de operación de los centros de acopio de leche nacional. México, 2011. [Consulta: 10 de julio de 2019]. Disponible en: <http://www.liconsa.gob.mx/wp-content/uploads/2012/02/00000315.pdf>

TITOUCHE, Y.; et.al. “Evaluación de la calidad microbiológica de la leche cruda producida en Área de Tizi Ouzou (Argelia)”. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances [en línea], 2016, (África) 11 (12), pp. 854-860. [Consulta: 07 de enero de 2020]. ISSN 1683-9919 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/310427683_Assessment_of_Microbiological_Quality_of_Raw_Milk_Produced_at_Tizi_Ouzou_Area_Algeria

UNIVERSIDAD DEL ZULIA. Introducción al control de calidad de la leche cruda. Maracaibo, 2003. [Consulta: 11 de mayo de 2019] Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/materialdeapoyoparapruebasdeplataforma_1693.pdf

UNIVERSIDAD DEL ZULIA. Determinación de grasa y sólidos totales en leche y derivados. Maracaibo, 2004. [Consulta: 11 de mayo de 2019] Disponible en: <https://docplayer.es/20892644-Determinacion-de-grasa-y-solidos-totales-en-leche-y-derivados.html>

VANEGAS, M.; et.al. “Aislamiento e identificación de *Enterobacter sakazakii* en lactarios de Bogotá, D. C”. Infectio [en línea], 2009, (Colombia) 13 (1), pp. 36-42 [Consulta: 1 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v13n1/v13n1a05.pdf>

VARGAS MENDOZA, Isabel Damaris. Determinación de la variación de algunas propiedades físicas en leche cruda de las regiones octava, novena y décima. [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría). Universidad austral de Chile. Valdivia-Chile. 2004. pp. 17-19 [Consulta: 11 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fav297d/doc/fav297d.pdf>

WILLMA FREIRE, B; et al. Tomo I: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de la población ecuatoriana de cero a 59 años. ENSANUT-ECU 2012 [En línea]. Quito – Ecuador: El telégrafo, 2014 [Consulta: 20 septiembre 2009]. Disponible en: <https://repositorio.flacsoandes.edu.ec/xmlui/handle/10469/7067>

WINGCHING, R.; & MORA, E. “Composición de la leche entera cruda de bovinos antes y después del filtrado. Agronomía Mesoamericana”. Redalyc [en línea], 2013, (Costa Rica) 24(1), pp. 203-207. [Consulta 07 diciembre 2019]. ISSN 1021-7444. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43726204019>.

ZADOCKS, R. Nuevos conceptos en la mastitis causada por *Klebsiella* [en línea], 2015, pp.1-3. [Consulta: 05 enero de 2020]. Disponible en: https://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criasalud/19/cys_19_nuevos_conceptos_mastitis.pdf

ZENDEJAS MANZO, G.; et.al. “Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación”. Biomed [en línea], 2014, (México) 25 (3), pp.129-143. [Consulta: 26 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>

ZÚÑIGA, I.; &g LOZANO, C. “Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud Resumen Introducción Epidemiología”. Medigraphic [en línea], 2017, 37(3), pp. 95-104. [Consulta 05 enero 2020]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2017/ei173e.p>

