



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

**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LA LECHE CRUDA**  
**COMERCIALIZADA EN MERCADOS POPULARES DE LA**  
**CIUDAD DE RIOBAMBA PROVINCIA DE CHIMBORAZO**

Trabajo de titulación presentado para optar por el grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: LOURDES MIREYA ABAD ALBAN**

**TUTOR: PHD FÉLIX ANDUEZA LEAL**

**RIOBAMBA–ECUADOR**

**2015**

©2015, Lourdes Mireya Abad Alban

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

---

LOURDES MIREYA ABAD ALBAN

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

El tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LA LECHE CRUDA COMERCIALIZADA EN MERCADOS POPULARES DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA PROVINCIA DE CHIMBORAZO**, de responsabilidad de la señorita Lourdes Mireya abad Albán, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
PhD, Félix Andueza <b>DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN</b>	_____	_____
Dr. Carlos Espinoza <b>MIEMBRO DE TRIBUNAL</b>	_____	_____
DR. Gerardo Medina <b>MIEMBRO DE TRIBUNAL</b>	_____	_____
<b>DOCUMENTALISTA SISBIB ESPOCH</b>	_____	_____
<b>NOTA DE TRABAJO ESCRITO</b>	_____	

Yo, Lourdes Mireya Abad Alban soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo

---

LOURDES MIREYA ABAD ALBÁN

## DEDICATORIA

A mi padre Juan y mi madre Célida por ser la base para llegar a esta meta, quienes fueron los coautores y testigos de este sueño.

A mi hermano Juan Carlos por ser el hombre en el que me apoye mil veces, mi hombro para llorar y la base de mis proyectos, mi mentor para la vida. ISC... ¡para siempre!

A mi tío Francisco por darme la mano cuando lo necesité, y darme fortaleza sin darse cuenta.

A Johnny por acompañarme estos últimos 5 años y estar a mi lado siempre.

Los amo

Mireya

## **AGRADECIMIENTO**

Al PhD. Félix Andueza y al Dr. Carlos Espinoza, mis tutores, por el todo apoyo brindado durante la realización del trabajo.

De manera muy especial al PhD. Gerardo Medina quien me brindó su apoyo, conocimientos y amistad cuando no tenía que hacerlo. ¡Muchas Gracias!

A las Dras. Aida, Paty e Isabel por ayudarme con toda disposición en lo que pudieron, las recordaré con mucho cariño.

A mis profesores cuyos nombres son una larga lista, por ayudarme cada escalón de la carrera, sobre todo al Dr. Francisco Portero, Dra. Olga Lucero, Dra. Cumanda Játiva, Msc. Carlitos Pazmiño y Msc. Diego Vinueza por regalarme sus conocimientos tanto académicos como de la vida, por ser mis guías y mis amigos.

Muchos son los nombres de quienes de diversas formas aportaron para esta tesis desde don Juanito conserje del Laboratorio clínico hasta Soñita secretaria de la escuela de Bioquímica y Farmacia.

A todos, ¡Gracias!

## TABLA DE CONTENIDO

<b>DERECHO DE AUTOR</b>	ii
<b>CERTIFICACIÓN</b>	iii
<b>DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD</b>	iii
<b>DEDICATORIA</b>	v
<b>AGRADECIMIENTO</b>	vi
<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	vii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	ix
<b>INDICE DE GRÁFICOS</b>	x
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	xi
<b>RESUMEN</b>	xii
<b>SUMMARY</b>	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPITULO I</b>	
<b>1 MARCO TEÓRICO</b>	7
<b>1.1 Marco filosófico o epistemológico de la investigación</b>	7
<b>1.2 Situación actual en la producción de leche en el mundo</b>	7
<b>1.3 Situación actual en la producción de leche en Ecuador</b>	8
<b>1.4 Situación actual en la producción de leche en Riobamba</b>	9
<b>1.5 Definiciones y tipos de leche</b>	9
<i>1.5.1 Definición bromatológica</i>	9
<i>1.5.2 Definición de la Normativa ecuatoriana</i>	10
<i>1.5.3 Tipos de leche</i>	10
<b>1.6 Como se produce la leche en vacas</b>	11
<i>1.6.1 Secreción</i>	11
<i>1.6.2 Eyeción</i>	12
<b>1.7 Características físico-químicas de la leche cruda</b>	12
<b>1.8 Valor nutricional de la leche cruda</b>	12
<b>1.9 Leche cruda y preferencia por el consumidor</b>	13
<b>1.10 Contaminación de la leche cruda</b>	14
<b>1.11 Efecto del calentamiento de la leche en los patógenos que pueden encontrarse en la leche cruda de vaca</b>	17

## **CAPITULO II**

<b>2. MARCO METODOLÓGICO</b>	18
<b>2.1 Muestreo</b>	18
<b>2.2 Cultivo y cuantificación</b>	18
<b>2.3 Aislamiento</b>	18
<b>2.4 Identificación</b>	18
<i>2.4.1 Observación de la morfología de las bacterias encontradas</i>	18
<i>2.4.2 Producción de catalasa</i>	19
<i>2.4.3 Producción de oxidasa</i>	19
<i>2.4.4 O/F (oxidación/ Fermentación) por cultivo Hugh-Leifson</i>	19
<i>2.4.5 Pruebas bioquímicas preliminares</i>	19
<i>2.4.6 Hidrólisis de gelatina</i>	20
<i>2.4.7 Hidrólisis de almidón</i>	20
<i>2.4.8 Sistemas de pruebas múltiples API</i>	20
<i>2.4.9 Resistencia a derivados de los carbpenem</i>	20
<b>2.5 Otros datos</b>	20

## **CAPITULO III**

<b>3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	20
<b>3.1 Análisis, interpretación y discusión de resultados</b>	20

**CONCLUSIONES** 31

**RECOMENDACIONES** 32

**BIBLIOGRAFÍA**

**ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-3:</b>	Cuantificación de bacterias aerobias heterótrofas y su porcentaje por muestreo y total	23
<b>Tabla 2-3:</b>	Cantidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, porcentaje por muestreo y total	24
<b>Tabla 3-3:</b>	Cantidad de bacterias por género-especie y su porcentaje por muestreo y total	27
<b>Tabla 4-3:</b>	Cantidad de bacterias género <i>Brucella</i> y su porcentaje por muestreo y total con relación al resto de bacterias	28
<b>Tabla 5-3:</b>	Cantidad de cepas de <i>Brucella</i> spp. con relación al número de cepas aisladas por muestreo en cada mercado y su porcentaje	28
<b>Tabla 6-3:</b>	Genero-especie identificados en cada muestra aislada	29
<b>Tabla 8-3:</b>	Características culturales, fisiológicas y bioquímicas de las cepas aisladas	31

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b>	Cuantificación de bacterias aerobias heterótrofas y su porcentaje por muestreo y total-Muestreo 1	23
<b>Gráfico 2-3:</b>	Cuantificación de bacterias aerobias heterótrofas y su porcentaje por muestreo y total-Muestreo 2	24
<b>Gráfico 3-3:</b>	Porcentaje de bacterias Gram negativas aisladas con relación a las Gram positivas	27
<b>Gráfico 4-3:</b>	Cantidad de bacterias por género-especie y su porcentaje por muestreo y total	28
<b>Gráfico 5-3:</b>	Porcentaje de <i>Brucella</i> spp. por muestra aislada	28
<b>Gráfico 6-3:</b>	Porcentajes de sensibilidad a meropenem e imipenem con respecto al total de muestras aisladas	29

## ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A.** Lista de los microorganismos patógenos humanos potencialmente presentes en la leche
- Anexo B.** Evaluación del riesgo microbiano relativo asociado con el consumo de leche cruda
- Anexo C.** 10 países con mayor producción en el mundo
- Anexo D.** Requisitos fisicoquímicos de la leche cruda
- Anexo E.** Fotografías de la prueba Gram en las muestras aisladas
- Anexo F.** Fotografías de las cepas resistentes a imipenem
- Anexo G.** Fotografías de la prueba de Oxidación y Reducción, en medio de Hugh y Leifson
- Anexo H.** Fotografías de la prueba de hidrólisis de gelatina
- Anexo I.** Fotografías de la prueba de hidrólisis de almidón
- Anexo J.** Fotografías de algunos puestos de venta de leche cruda

## RESUMEN

Se realizó un estudio microbiológico de 7 puestos de venta de leche cruda en los Mercados San Alfonso, La Condamine y Mercado Mayorista de Riobamba, para evaluar la presencia de bacterias patógenas. Se sembró las muestras recolectadas en agar Farrell, se cuantificó las colonias obtenidas, y se las aisló en Agar Mueller Hinton obteniéndose 33 cepas bacterianas, luego se las identificó mediante prueba Gram, catalasa, oxidasa, hidrólisis de gelatina, hidrólisis de almidón, pruebas bioquímicas: urea y citrato. Para la identificación de género y especie se utilizaron sistemas múltiples Analytical Profile Index (API). La cantidad de bacterias para todas las muestras fueron menores a  $1.5 \times 10^6$  UFC/mL. Las bacterias encontradas y sus porcentajes con relación al total fueron: 27.27% de bacterias del género *Bacillus*, 17,39% de *Brucella spp.* y *Aeromonas hidrófila*, 13,04% de *Enterobacter sakazakii* y 4.35% *Serratia plymuthica*, *Escherichia coli*, *Burkodelia cepacia*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus warneri*. Se realizó también una prueba de resistencia a meropenem e imipenem (antibióticos) de los cuales solo se encontró resistencia en un 6.25% de los casos. Los resultados obtenidos no cumplen con la Norma Técnica Ecuatoriana 9. Leche cruda. Requisitos, la cual establece que en la leche cruda debe existir ausencia de microorganismos patógenos, por lo que la venta de esta leche cruda constituye un riesgo de salud pública. Se concluye que la contaminación probablemente se debe a que no se aplicó buenas prácticas de ordeño, de transporte o almacenamiento. Se recomienda hacer un nuevo estudio de seguimiento en la cadena láctea de manera que se puedan encontrar puntos críticos de control y puedan a su vez ser resueltos.

**Palabras clave:** <MICROBIOLOGÍA>, <LECHE CRUDA>, < MERCADOS DE RIOBAMBA>, < BACTERIAS PATÓGENAS [*Aeromonas hidrófila*] >, < BACTERIAS PATÓGENAS [*Brucella spp.*]>, <PRUEBAS BIOQUÍMICAS>, <SISTEMAS MÚLTIPLES>, < ANALYTICAL PROFILE INDEX [API]>.

## SUMMARY

A study was conducted of seven sales stalls of raw milk in the Market of San Alfonso, La Condamine and Mercado Mayorista de Riobamba, to assess the presence of pathogenic bacteria. The collected samples were seeded in agar Farrell, it was quantified the colonies obtained, and it was isolated in Mueller Hinton Agar being obtained 33 bacterial strains, after, they were identified by Gram test, catalase, oxidase, gelatin hydrolysis, starch hydrolysis, biochemical tests: urea and citrate. For the identification of gender and species were used multiplied systems like: Analytical Profile Index (API). The amount of bacterias was lower for all samples to  $1.5 \times 10^6$  UFC/mL. The bacteria were found and their percentages in relation to the total were: 27.27% of bacteria of genus *Bacillus*, 17.39% of *Brucella spp.* and *Aeromonas hydrophila*, 13.04% of *Enterobacter sakazakii* and 4.35% *Serratia plymuthica*, *Escherichia coli*, *Burkodelia cepacia*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus warneri*. It was also performed a resistance test to meropenem and imipenem (antibiotics) from which it was found a resistance in a 6.25% of the cases. The results obtained not fulfilled with the Ecuadorian Technical Standard 9. Raw Milk. Requirements, which it establish that in raw milk, there must be absence of pathogenic microorganism, therefore, the sale of this raw milk constitutes in a risk to public health. It concludes that the contamination probably is because it did not apply, good milking practices, transport or storage. It is recommended to make a new follow-up study in the dairy chain so that it can find Critical Control Points can in turn be solved.

**KEYWORDS:** <MICROBIOLOGY>, <RAW MILK>, <RIOBAMBA MARKETS>, <PATHOGENIC BACTERIAS [*Aeromonas hydrophyla*]>, <PATHOGENIC BACTERIAS [*Brucella spp*]>, <BIOCHEMICAL TESTS>, <MULTIPLE SYSTEMS>, <ANALYTICAL PROFILE INDEX [API]>.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Situación Problemática**

La leche cruda es un medio propicio para el crecimiento de diversos microorganismos, ya que es uno de los alimentos con mayor complejidad por su riqueza en nutrientes y por esto un producto perecedero, esta situación la ubica entre los alimentos que se deben cuidar minuciosamente durante toda la cadena agroalimentaria para evitar la contaminación y proliferación de microorganismos oportunistas que pueden ser perjudiciales a la salud humana, este escenario puede ser variado mediante el uso de las Buenas Prácticas de Manejo y Manufactura desde la producción hasta el consumo de la leche. (Eurídice, 1995, p. 361)

En 2013 Chimborazo produjo el 10,69% de leche bovina vendida en líquido, ubicándolo en el cuarto lugar en la Región Sierra, quien es el mayor productor con un 85.88% de la producción total de leche vendida en líquido en Ecuador. (INEC, 2013, <http://www.ecuadorencifras.gob.ec>) Esta cifra nos hace estimar que es una de las provincias con un consumo considerable; se sabe también que la leche se adquiere cruda para salvaguardar propiedades que se cree entre los consumidores, podrían perderse durante el procesamiento además de sus bondades organolépticas. (Claeys W. et. al., 2012, p. 254)

Por otra parte, la falta de conocimiento y facilidades de accesos a implementos e insumos para el manejo adecuado, o el descuido del productor durante su producción y almacenamiento, son factores que pueden ser causa de una mala higiene de la leche cruda disponible para la venta, dando como efecto adyacente la contaminación en la producción, transporte y almacenamiento, así como la baja en el precio para el productor por la necesidad de venderla antes del deterioro. Lo señalado anteriormente puede traer como consecuencia enfermedades zoonóticas de origen bacteriano, las cuales pueden ser transmitidas por los alimentos. (Claeys W. et. al., 2012 p. 253)

En lo que corresponde a las Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Chimborazo, 2010 fue el año que más casos reportó (21484 casos) desde 1994 de una tasa de 4.51 baja para el 2014 a 3018, con una tasa de 29 en enfermedades diarreicas (MSP, 2014, <http://www.salud.gob.ec>), sin embargo esta última no es una cifra alentadora en relación a el problema que presentan las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS) en la población.

Chimborazo se sitúa como la quinta provincia con mayor tasa de morbilidad en enfermedades diarreicas de origen infeccioso, las cuales en esta provincia son la cuarta causa de morbilidad, los grupos más afectados son los adultos de 20 a 49 años con un 30.40%, seguido de los niños

de 1 a 4 años con un 16.40% y los de 5 a 9 años con un 11.23%, (MSP, 2013, <http://www.salud.gob.ec>), lo que es de considerar, ya que la FDA (2014. <http://www.fda.gov>) menciona que la enfermedades diarreicas son provocadas generalmente por enfermedades transmitidas por alimentos sobre todo los perecederos dentro de los cuales se ubica la leche.

## **Formulación del Problema**

### ***Problema General***

¿La leche cruda expendida en mercados populares de la ciudad de Riobamba provincia de Chimborazo, cumple con los parámetros microbiológicos establecidos en la normativa Nacional e Internacional sobre la calidad sanitaria de las leches crudas de origen bovino?

Ya habíamos mencionado que Chimborazo es una provincia de producción y gasto de leche cruda considerable, y Riobamba es la ciudad principal para su expensa, trayendo consigo todos los problemas relacionados con su consumo sobre todo los de la salud, si no es tratada adecuadamente durante toda la cadena agroalimentaria de la leche.

Para ello, tanto el productor como el vendedor deben estar capacitados en el manejo de este alimento tan perecedero, sin embargo, estimamos que existen una buen porcentaje de personas campesinas que desconocen de políticas gubernamentales de capacitación y financiamiento que les ayudarían a ejecutar buenas prácticas de manufactura, o que existen otros motivos por los cuales expenden leche sin ningún cuidado, problema que resulta preocupante con respecto a la inocuidad.

La Norma ecuatoriana e internacional establece que la leche cruda para expensa debe estar libre de patógenos, los cuales podrían causar enfermedades graves como las ETA (Enfermedades transmitidas por alimentos) y la EDA (Enfermedades diarreicas agudas), lo que sería un problema serio con un alimento habitual y en una de las provincias con población media de Ecuador, por lo que se pretende realizar un estudio microbiológico de manera que se evidencie si la leche a la venta es o no apta para consumo humano.

### **Antecedentes de la Investigación**

Flores, et al. (2010, p. 81) en su tesis realizada en El Salvador, “Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas de leche entera y pasteurizada comercializada en diferentes lugares de la ciudad de San Miguel”, en el que realizó recuento de coliformes fecales,

*Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*, mediante el método del número más probable por mililitro de leche (NMP/ml). recuento de coliformes totales en el laboratorio se realizó la prueba mediante el método de unidades formadoras de colonia por mililitro de leche (UFC/mL), en los que obtuvieron como resultados que la leche cruda no era apta para consumo humano sin antes someterla a procesos térmicos, y que además todos los corrales de ordeño así como los puestos de venta de leche cruda estudiados, no cumplen con las normas de calidad salvadoreña.

Una revisión realizada por Oliver (2005, pp. 115-129), en la que destaca que la leche puede ser fácilmente contaminada por estos microorganismos, las heces de los animales contaminados puede a su vez contaminar alimentos de otros bovinos con posterior acrecentamiento y mayor difusión fecal en todo el hato y otros animales cercanos, esto se reafirma con el hecho de que se encontraron estos mismos patógeno en granjas cercanas, esto es muy crítico cuando la leche cruda o productos lácteos contaminados pueden ser ingeridos por el ser humano y causarle ETAS (Enfermedades transmitidas por alimentos).

Arrieta L. (2011, p. 50), en su tesis “Evaluación microbiológica de la leche y productos lácteos producidos en 4 expendios de la zona metropolitana de Morelia” en México, analizó aerobios mesófilos, coliformes totales y coliformes fecales, donde encontró contaminación mayor en el proceso de producción que en la leche cruda, sobre todo en el queso, no encontró cumplimiento en ninguno de los expendios estudiados con las normas mexicanas.

Mariscal et. al. (2013, p. 20), efectuaron un estudio en Trinidad, Bolivia para determinar las características microbiológicas de leche cruda de vaca, mediante el método de recuento estándar en placas en el medio de cultivo, Recuento en Placa Agar para bacterias mesófilas aerobias (BMA) y Agar MacConkey para organismos coliformes, donde todas las muestras se encontraron en tempeturas fuera de rango. El 14,3% presentaron impurezas; un 42,9% sabor ligeramente ácido; y en el 42,9% olor fue agrio. Se concluye que la leche cruda de vaca, expendida en mercados de abasto de la ciudad de Trinidad, está fuera de los rangos microbiológicos recomendados y no cumple con la calidad e inocuidad establecida para dispendio humano.

Otro estudio se realizó por Tassew y Seifu (2011, pp. 31-33), para evaluar la calidad microbiológica de la leche cruda de vaca de los agricultores y cooperativas lecheras de Bahir Dar Zuria y distrito Mecha, tomando en varios muestreos. Concluyendo que la calidad higiénica de la leche cruda de vaca de las cooperativas lecheras era deficiente y que esto se debía corregir para su venta.

Swai y Schoonman (2011, pp. 217–222), valoraron la calidad microbiológica de leche cruda así como sus riesgos en la salud humana por causa de su consumo, la leche era comercializados en la Región de Tanga de Tanzania. Donde concluyen que el mercado de leche cruda en el área de estudio es de mala calidad bacteriológica y peligrosa para el consumo humano.

### **Justificación teórica**

La leche es un producto químicamente complejo, está compuesto de agua, carbohidratos, lípidos y proteínas en su mayoría, esto además de fosfolípidos, minerales, vitaminas, varios compuestos orgánicos y enzimas, por lo que se la considera un alimento aportador principal de la dieta diaria muy rico en nutrientes. Esta composición la convierte en fácilmente perecedera, que puede ser contaminada durante la producción, transporte, almacenamiento y expendio, siendo necesaria la cadena fría en todo su transcurso. Por lo cual se hace necesario la recolección y el análisis de datos que sirvan para poner en evidencia las características microbiológicas y de contaminación de la leche cruda que se vende de forma intermediaria o directa al consumidor, y sobre todo para quienes gustan de ella como producto crudo. En este sentido, la realización del presente trabajo servirá de base para la acción de las autoridades en la capacitación y apoyo al productor así como al vendedor, ayudando de esta manera a la cultura preventiva y no curativa en el sistema de Salud vigente, determinando las causas externas por las que se originan tales condiciones.

La ley orgánica de la Salud en su artículo 146, numeral e, establece la prohibición de la expensa de leche en condiciones no aptas para consumo humano, así como la norma NTE INEN 0009 (2012, p.1), en la cual se plantea que la leche cruda se considera no apta para consumo humano cuando contiene bacterias patógenas o un “*contaje microbiano superior al máximo permitido por la norma*”. Además, en las políticas ecuatorianas del Buen Vivir se establece como una tarea importante para el investigador, la de mejorar la calidad de vida en su objetivo tres (SEMPLADES, 2013, <http://www.buenvivir.gob.ec/objetivo-3.-mejorar-la-calidad-de-vida-de-la-poblacion>) normativa en la que nos apoyamos como base para la ejecución de la presente investigación. Atendiendo a los argumentos antes mencionados y para reunir evidencias que clarifiquen las condiciones microbiológicas de la leche cruda expendida en mercados de la ciudad de Riobamba, se ha realizado el presente estudio con un total de siete muestreos distribuidos entre los mercado San Alfonso, La Condamine y el mercado Mayorista.

## **Justificación práctica**

Muchas investigaciones de microbiología en leche cruda han comprobado que si no existe Buenas Prácticas de Manejo y Manufactura durante su cadena agroalimentaria los resultados microbiológicos son preocupantes como el de Jaramillo y Yépez (2013 pp. 44-51) en Pastaza o el de Ayala y Tobar (2014, p. 50), en Carchi, Imbabura y Pichincha sobre brucelosis bovina, que se describen en el marco teórico de este proyecto, donde se utilizan métodos sencillos y material disponible, además estudios así se han realizados muy numerosos en todo el mundo con diferentes metodologías que fueron desarrolladas y siguen aún por parte de la comunidad científica, confirmando la importancia de los análisis microbiológicos y su factibilidad a la hora de efectuarlos.

La disponibilidad no es un obstáculo para la presente investigación ya que se utilizan métodos que pueden ser tan sencillos como eficientes; además existe disponibilidad de algunos equipos sofisticados (como la cámara de flujo laminar y un esterilizador automático) del Laboratorio de Investigación dentro del Laboratorio Clínico de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, material necesario de bodega de esta misma institución, personal tutor quien posee conocimientos sólidos en la materia y acceso a bases de datos confiables. Algo a destacar es que la ejecución de la última parte de la identificación fue realizada en sistemas de pruebas múltiples en países como Venezuela y México gracias a la gestión directa y total de nuestro tutor quien se ha comprometido constantemente con el proyecto. Todos estos puntos aseguran la suficiencia de recursos y confiabilidad de los resultados facilitando de manera muy positiva su ejecución.

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Evaluar de la calidad microbiológica de la leche cruda bovina que se comercializa en los mercados populares de la ciudad de Riobamba provincia de Chimborazo.

### ***Objetivos Específicos***

- Recolectar las muestras de leche cruda bovina en los puntos de venta de los mercados San Alfonso, Condamine y Mayorista de la ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo.

- Cuantificar la cantidad de bacterias aerobias heterótrofas presentes en las muestras de leche cruda bovina de los mercados San Alfonso, Condamine y Mayorista de la ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo.
- Determinar la presencia de cepas de bacterias del genero *Brucella* en las muestras de leche cruda bovina de los mercados San Alfonso, Condamine y Mayorista de la ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo.
- Aislar e identificar taxonómicamente las colonias bacterianas crecidas en los medios de cultivos utilizados.
- Determinar los perfiles de susceptibilidad a antibióticos derivados de los carbapenems de las cepas bacterianas aisladas e identificadas.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Marco filosófico o epistemológico de la investigación

La investigación se realizó por método transversal proveyendo a quien interesa evidencia mediante la obtención de datos cuantitativos y cualitativos a través de comparaciones de la situación del producto con lo que establece normativa vigente, analizando la microbiología patógena del mismo. (Muñoz, 2007, p. 8) Se aíslan los especímenes en cuestión de las muestras y se procede a analizarlas de acuerdo al método escogido.

Las técnicas para desarrollar el método cualitativo se realiza mediante observaciones programadas en unos tiempos definidos (o parcialmente definidos de acuerdo a la naturaleza de los especímenes estudiados) además de conjunto de parámetros con los que se marcan diversificaciones, después de la recolección y el cumplimiento del método, utilizando numeraciones en los especímenes ya diferenciados y organizados. (Muñoz, 2007, p. 8)

Así mismo se utilizan método cualitativos, se utiliza la observación de distas en caracteres organolépticos resultados de reacciones químicas que son específicas de cada espécimen (Muñoz, 2007, p. 9)

### 1.2 Situación actual en la producción de leche en el mundo

Según la FAO (2013, <http://www.fao.org/>) en leche bovina representa 85% de la producción mundial con relación a otras especies, los países con mayor producción son India, USA, Brasil y China con un 18, 12.5 y 5% respectivamente (otros países de mayor producción y sus porcentajes se encuentran en el anexo C); solo en la Unión europea (28 países) en 2013 fue de 153774.47 miles de toneladas (EUROSTAT, 2013, <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/submitViewTableAction.do>). Europa es una de las potencias en producción lechera por la mejora genética sobre todo Holstein y el desarrollo de tecnologías de manejo; además el precio medio de la leche en la Unión Europea aumento del 17 % en enero del 2014 en relación a enero de 2013 el más alto desde 1997 (Comisión Europea, 2014, <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/submitViewTableAction.do>). En Asia occidental y África existe menor producción ya sea por motivos económicos o culturales.

Respecto al mercado lechero se produce mayormente de manera informal, las personas prefieren hervirla en casa debido a que el procesamiento y el envasado incrementan el costo. Por otro lado en países en desarrollo el procesamiento de leche genera empleo y mejora la economía, e implementan políticas para reducir las importaciones de leche, y aumentar la producción y exportación, sin embargo se enfrentan a problemas como que estos productos son altamente perecibles lo disminuye la comercialización internacional en un 13%. (FAO, 2015, <http://www.fao.org/agriculture/>)

En América del norte la producción per cápita es de 250 kg anual, mientras que en América central de 100 kg anual, en Caribe de 50 kg anual y en Sur América sube a 180 kg anual donde el dato anómalo positivo sería Brasil. (FAO, 2013, [http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/the-dairy-chain/markets-and-trade/es/#.VhrS1vL\\_Oko](http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/the-dairy-chain/markets-and-trade/es/#.VhrS1vL_Oko)) En América existen países en vías de desarrollo y subdesarrollo lo que nos hace considerar que la tecnología y genética no está muy avanzada, hace falta políticas accesibles para la producción, además de capacitación y emprendimiento, ya que la leche en un negocio rentable mientras existan buenas prácticas en lo social y financiero.

### **1.3 Situación actual en la producción de leche en Ecuador**

En Ecuador se utilizan tres tipos de producción: Extensivos Semi-intensivos e Intensivos. El primero se caracteriza por la falta de tecnología en aspectos, tales como, manejo, pastos y sanidad animal. Además, con bajas cargas de animales por hectáreas, 0.7 Unidades Bovinas Adultas (UBA) y producciones lácteas de 900 litros por campaña. Mientras que el segundo se utiliza baja carga animal y poca tecnificación, en el tercero que es muy recomendable, es un sistema que se utiliza en bajo porcentaje, pero mayor tecnificación. Asimismo, los principales problemas de la producción bovina de leche son: Nutricionales, Sanitarios y de Manejo. (Davis et al., 2003, p. 48).

En los últimos años el desarrollo ganadero ha tenido un gran avance, ya que en Ecuador existe políticas Agropecuarias mediante Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, dirigidas a asociaciones de ganaderos con el fin de mejorar la calidad e inocuidad de la leche, lo que permite el alza de precios y la desaparición de intermediarios, con asistencia técnica frecuente y financiamiento parcial destinados a pequeños y medianos ganaderos. (MAGAP, 2015, <http://www.agricultura.gob.ec/programas-y-servicios>).

Muchos ganaderos se han beneficiado de esta política que ha estado contribuyendo el desarrollo de la producción en una buena proporción (MAGAP, 2013, <http://www.agricultura.gob.ec/programas-y-servicios/>), sin embargo estimamos que existen distintas causas por las que los campesinos no las

gestionan, una de ellas es por desconocimiento, sobre todo en lugares en zonas rurales de poco alcance, otro inconveniente es que les es difícil la transición a nuevas estrategias políticas, y a llevar asociaciones por desacuerdos frecuentes y la disponibilidad disímil entre ellos.

#### **1.4 Situación actual en la producción de leche en Riobamba**

Riobamba es la principal ciudad de concentración en comercio, el producto es transportado desde comunidades cercanas, los controles por parte de organismo regulador son pocos, y la expensa se torna bastante desordenada y sin ningún cuidado. Consideramos que el problema viene desde la raíz, ya que el productor puede o no estar capacitado para el manejo adecuado.

Otro problema que se puede observar es que el transporte hacia las plantas de procesamiento o para la venta directa, no cuenta con un sistema apropiado, lo realizan en tanques de plástico, recipientes mal higienizados. Algunas personas utilizan sustancias no permitidas para la conservación afectando de esta manera a los procesadores y compradores, además no cuentan con un sistema de frío durante el almacenamiento, ni el transporte.

#### **1.5 Definiciones y tipos de leche**

##### ***1.5.1 Definición bromatológica***

La FDA (2015, <http://www.fda.gov>) define a la leche cruda como “la secreción limpia y fresca obtenida por el ordeño de vacas sanas, adecuadamente criadas y alimentadas, excluyéndose aquella secreción obtenida 5 días antes y 5 días después del parto, o durante el periodo necesario para que la leche esté libre de calostro”.

*“La leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenida mediante uno o más ordeños, sin ninguna ubicación de adición o extracción, destinados al consumo como leche líquida o elaboración ulterior.”* (CODEX STAN 206-19991, 2006, <http://www.codexalimentarius.org/codex-home/es/>)

*“Se entiende por leche cruda o “leche” sin otro calificativo al producto íntegro normal y fresco obtenido del ordeño ininterrumpido e higiénico de vacas sanas”* (COVENIN, 903-93, p. 1)

Según el Código alimentario Español (2012, [http://www.boe.es/diario\\_boe/txt.php?id=BOE-A-1967-16485](http://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-1967-16485)), *“Se entiende por leche natural el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros,*

*del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas”.*

### **1.5.2. Definición de la Normativa ecuatoriana**

*“Leche. Producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada a un tratamiento posterior previo a su consumo.”* (NTE INEN 9, 2012, p. 1).

*“Leche cruda. Leche que no ha sido sometida a ningún tipo de calentamiento, es decir su temperatura no ha superado la de la leche inmediatamente después de ser extraída de la ubre (no más de 40°C).”* (NTE INEN 9:2012, p. 1).

*“La calidad de la leche, como de cualquier otro producto o insumo se refiere al ajuste del mismo a las especificaciones establecidas. Conformar tres aspectos bien definidos: composición físico química, cualidades organolépticas y cualidades microbiológicas todas estas establecidas por las normativas legales vigentes.”* (Vargas, 2000, Conf. 297-302)

En nuestro caso la normativa vigente a seguir es la NTE INEN 9:2012. Leche cruda requisitos, donde detalla la calidad microbiológica para las leche de expendio público.

### **1.5.3 Tipos de leche**

La Norma Mexicana F-026 (1997, <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-026-1997.PDF>) la clasifica:

- *“Leche cruda*
- *Leche para consumo humano*
- *Leche pasteurizada*
- *Leche ultra pasteurizada*
- *Leche evaporada*
- *Leche condensada azucarada*
- *Leche en polvo o deshidratada”*

La Norma Técnica Ecuatoriana 12 (1973, p. 1) da los siguientes tipos de leche:

- “*Leche fresca.*
- *Leche homogeneizada (pasteurizada o esterilizada).*
- *Leche descremada o semidescremada.”*

## **1.6 Como se produce la leche en la vaca**

Las glándulas mamarias en bovinos se desarrollan durante la pubertad, durante el cual existen cambios en la secreción de estrógenos que son los responsables del desarrollo del sistema dúcil de las glándulas mamarias en el estro, mientras que la progesterona más los estrógenos causan el desarrollo alveolar. Durante la gestación la progesterona inhibe el desarrollo funcional secretor de las células epiteliales de los alveolos y además la producción intracelular de enzimas necesarias para la secreción de la leche. Justo antes del parto, la producción de prolactina potenciada por glucocorticoides y hormona de crecimiento por parte de la hipófisis, aumenta, estimulando la función anatómica y funcional secretora. La placenta de los rumiantes produce la somatotropina coriónica un lactógeno que incrementa la producción en la gestación tardía en rumiantes que se cree que tiene mayor potencia que la prolactina. Sin embargo en vacas la prolactina no parece ser la principal hormona de secreción de leche más bien la hormona de crecimiento parece estimular en mayor proporción. (Frandsen et. al., 2009, p. 450)

### ***1.6.1 Secreción***

La células epiteliales que rodean al alveolo son responsables de la producción de leche a partir del torrente sanguíneo, en este son transportados los ácidos grasos C16 y C18 y otros, minerales vitaminas y agua proveniente de la alimentación, las proteínas, ácidos acético y  $\beta$ -hidroxibutírico del rumen y la lactosa del hígado, además ácidos grasos C18 provienen también de la grasa corporal, que servirán para la síntesis de componentes de la leche (Callejo, 2010, [http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordeno-mecanico/Tema\\_1.\\_Anatomia\\_y\\_Fisiologia](http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordeno-mecanico/Tema_1._Anatomia_y_Fisiologia)). Los lípidos son sintetizados, empaquetados en gotitas y expulsados hacia el lumen del alveolo mientras son cubiertos con una membrana proveniente de la membrana celular. Las células también producen vesículas que contienen las caseínas, se denominan micelas, donde la  $\kappa$ -caseína mantiene la solubilidad incluso después de ser liberada de la célula. Lactosa también es liberada en vesículas, creando una fuerza osmótica que introduce agua desde citosol celular; todos esta mezcla de componentes son expulsados por exocitosis. Los mecanismos pueden ser de excreción son merócrinas y apócrinos. (Frandsen et. al., 2009, p. 451)

### **1.6.2. Eyeción**

El amamantamiento o el ordeño son estímulos para la secreción cisternal de leche mientras que la oxitocina producida por el lóbulo posterior de la hipófisis es la hormona responsable de la contracción de las células mioepiteliales ubicadas por encima de la red de vasos sanguíneos y la capa epitelial secretora de los alveolos para la expulsión de leche alveolar; así mismo estímulos externos inhibirla como el estrés pueden y como el llamado de la cría aumentarla. (Frandsen et. al., 2009, p. 451)

### **1.7 Características físico-químicas de la leche cruda**

La leche cruda debe tener características especificadas por la NTE INEN 9:2012. Leche cruda. Requisitos: “*blanca opalescente o levemente amarillento, Olor suave, característico, libre de olores terceros, homogéneo, libre de cuerpos extraños*”. Otros requisitos físicos y químicos de la legislación ecuatoriana, se encuentran en el Anexo 4.

### **1.8 Valor nutricional de la leche cruda**

Aproximadamente 80% de las proteínas de la leche consisten en caseína ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína). (Claeys et. al., 2012, p. 254). Las moléculas de caseína son precursores de varios péptidos bioactivos, con actividad y como vector de propiedades antimicrobianas para el calcio, zinc, iones de cobre, hierro y fosfato en el cuerpo (Ebringer et. al., 2008, pp. 378-394). Los péptidos bioactivos son cadenas cortas de aminoácidos que son inactivos en la proteína nativa, pero tienen un efecto fisiológico en el cuerpo después de la liberación por ejemplo, enzimas de procesamiento digestivos (Haug et. al., 2007, pp. 69-65)

Las otras proteínas de leche, suero de leche, incluyendo  $\alpha$ -lacto albúmina,  $\beta$ -lacto globulina, albúmina sérica, inmunoglobulinas, enzimas e inhibidores de enzimas, metal (lactoferrina) y vitaminas, proteínas de unión, varios factores de crecimiento, péptidos de bajo peso molecular (proteasa-peptona) y péptidos bioactivos que también tienen importantes propiedades fisiológicas. (Claeys et. al., 2012, p. 254)

El calentamiento principalmente modifica las propiedades funcionales de proteínas de la leche (por ejemplo emulsionante y agua, propiedades de solubilidad) pero tiene poco efecto en su digestibilidad y propiedades nutricionales (Douglas et. al., 1981, p. 14). El aminoácido esencial más relevante en la leche es la lisina. Sólo se observaron pequeñas pérdidas (1-4%) de la cantidad disponible después calentar la leche (Andersson & Oste, 1995, pp .279-307). El efecto del

calentamiento en los aminoácidos parece ser insignificante, cuando sus niveles en la leche cruda son comparados con los tratados con leche UHT (Andersson & Oste, 1995, pp. 279-307).

En cuanto a la grasa de la leche y de los animales (la genética, la etapa de la lactancia, ruminal fermentaciones, infecciones de la ubre) y alimentos (cereales, energía y dietética la ingesta de proteínas, los efectos estacionales y regionales) relacionados con factores explican las variaciones en la composición y cantidad de ácidos grasos. (Jensen, 2002, pp.295-350)

Debido al alto nivel de ácidos grasos saturados, la grasa de leche a veces se asocia con obesidad y las enfermedades cardiovasculares (ECV). Sin embargo, con base en una revisión reciente de estudios epidemiológicos no parece haber ninguna relación consistente entre una alta la ingesta de productos lácteos y ECV (Astrup et. al., 2011, pp.684-685)

El ácido láurico, puede tener propiedades antivirales y antibacterianas funciones, y pueden actuar como un anti-caries y agente anti placa. El ácido esteárico no parece aumentar el colesterol sérico concentración, y no es aterogénico (Ebringer et. al., 2008, pp. 378-394; Haug et. al., 2007, pp. 69-65). Además, la leche contiene un rico espectro de insaturado ácidos grasos (por ejemplo, omega-6 y omega-3 los ácidos grasos, conjugados ácido linoleico) y los componentes funcionales importantes (por ejemplo, esfingolípidos), y es un importante medio de ciertos nutrientes, como las vitaminas liposolubles (Ebringer et. al., 2008, pp. 378-394; Haug et. al., 2007, pp. 69-65).

## **1.9 Leche cruda y preferencia por el consumidor**

Una revisión realizada por Claeys W. et. al. (2012, p.251) es una buena base de justificación para el presente estudio y nos dice lo siguiente: En el contexto de la tendencia predominante hacia productos más naturales, parece que hay una creciente preferencia por el consumo de leche cruda como leche cruda se asocia con varios beneficios para la salud percibidas que se cree que ser destruidos tras el calentamiento. Sin embargo, muchos agentes patógenos humanos pueden aislarse a partir la leche cruda de vaca. La prevalencia de patógenos en la leche cruda de vaca varía, pero su presencia ha demostrado en muchos estudios y las infecciones transmitidas por los alimentos se han reportado en varias ocasiones por *Campylobacter*, *Salmonella* spp. y patógeno humano *Escherichia coli* verocitotoxina productora.

En Riobamba las algunas personas prefieren el consumo de leche cruda que se la consigue localmente en los mercados, justamente por lo que menciona este estudio acerca de sus propiedades benéficas. Sin embargo, continúa esta revisión, debido a su alto valor nutricional

junto con el pH neutro y alta actividad de agua, la leche cruda sirve como un medio de crecimiento excelente para diferentes microorganismos, cuya multiplicación depende principalmente de la temperatura y sobre los microorganismos y sus productos metabólicos de la competencia. (Claeys W. et. al., 2012, p. 252)

### **1.10 Contaminación de la leche cruda**

De la misma forma como la leche es un alimento bastante completo puede ser fuentes otros microorganismos que pueden ser perjudiciales para la salud, la FDA (2014) informa que de acuerdo con el Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), entre 1993 y 2006 se enfermaron más de 1500 personas en los Estados Unidos por beber leche cruda o comer queso elaborado con esta y que además que puede contener bacterias peligrosas como *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria*.

En Argentina más del 50% de los casos de tuberculosis se debe a contagio por ganado; esta aseveración nos da la tentativa de que la exposición podría enfermar de manera alarmante a la población, cuyos factores de riesgo son: la ingestión de leche o derivados crudos, la inhalación por vía aerógena, por contacto con animales enfermos o aerosoles producidos en la faena. (Torres, 2008, pp.15)

Además Jaramillo y Yépez (2013, pp. 44-51), realizaron una determinación de seroprevalencia y factores de riesgo en Pastaza encontrando una prevalencia de 34% por finca y 1.0 % por animal; el estudio de Agurto y Fernandez (2013, pp. 48-117) en un estudio de prevalencia de Brucelosis bovina en Ingapica provincia de Cañar encontraron 0.021%. Una tesis realizada por Ayala y Tobar (2014, p. 50), con una incidencia 1.5%, o en Carchi, Imbabura y Pichincha en 2009, se presentó diferentes porcentajes de infección por *Brucella abortus*, la incidencia fue de 8.52 %, 0.75 % y 0.36 % respectivamente; revelan el riesgo de zoonosis preocupante en a nivel nacional.

Los utensilios son de especial cuidado ya que estos son reservorios de bacterias que se multiplicarán al contacto con la leche, peor aún si los utensilios envejecen ya que formaran pequeñas grietas, sitio ideal que encuentran los microorganismos para refugiarse del lavado. (Magariños, 2000, p. 22)

El ambiente tiene una carga microbiana muy variada que depende de las condiciones de higiene y limpieza, por lo que puede haber contaminación inofensiva pero que puede causar

acidificación. De la misma forma en el transporte y almacenamiento y expendio, los medios a la que es sometida la leche pueden ser puntos clave en la contaminación. (Magariños, 2000, pp. 17-20)

Es probable su contaminación en cualquier momento de la manipulación, aun cuando la leche se encuentra estéril en la ubre de la vaca, puede ocurrir incidentes sobre todo en ganado no estabulado, como golpes, o contaminación por contacto directo en pezones muy abiertos lo cual le producirá la inflamación con la consiguiente infección, con una curva de crecimiento relativamente lenta lo que hará invisible la contaminación a menos que exista control rutinario. (Magariños, 2000, p. 21)

La contaminación por manipulación constituye un problema, ya que el ordeñador debe estar lo suficientemente capacitado en higiene de producción, y para ello debe plantearse una rutina de ordeño e higiene personal que cada manipulador debe conocer, además debe usar vestimenta adecuada y limpia, además el manejo del alimento animal también debe ser de manera que no exista contacto con la leche; todo esto sumado a las condiciones de ambiente y el montaje de equipos de manera que sean muy bien y fácilmente lavados. (Magariños, 2000, p. 22)

También debemos tomar en cuenta que manipulador no debe padecer de enfermedades contagiosas que pueden contaminar la leche, estas pueden ser por causas ambientales o por contagio de otros animales o personas, constituyendo un riesgo durante el periodo de incubación y crecimiento en enfermedades transmisibles en portadores. Si es necesario trabajar cuando se está enfermo se debe tomar las debidas precauciones para no contaminar el producto.

Aún con la refrigeración existen bacterias psicrófilas que pueden acidificar la leche por lo que perece en poco tiempo Román et. al., (2003, p. 146-147). Este estudio lo realizo para evaluar la calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria de la leche cruda almacenada en los silos refrigerados de cuatro industrias localizadas en los estados Zulia, Trujillo y Mérida en Venezuela encontraron que la calidad higiénica fue deficiente y se caracterizó por elevados recuentos de mesófilos y psicrótrofos totales.

Los microorganismos son de una variedad espectacular, además los patógenos que según la normativa ecuatoriana y mundial no deben existir en leche cruda de consumo (ni en ninguna otra leche de consumo), algunos son:

- Bacterias termófilas (*Staphylococcus toxígenos*)
- Bacterias acidificantes (fermentos lácteos)
- Bacterias Coliformes (productoras de mal gusto y olor) (Flores et. al., 2010, p. 81)

- Bacterias patógenas para humanos que pueden estar presentes en la leche cruda de vaca

Existe diversidad de patógenos en leche cruda de vaca, alguno los presentamos en el Anexo A.

Infecciones por *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* O157: H7, y *Listeria monocytogenes*, así como las intoxicaciones por *Staphylococcus aureus* se identifican con mayor frecuencia como la causa de los brotes humanos debido al consumo de leche cruda o productos hechos de los mismos (Barrett, 1986, pp. 266-269; Oliver, et. al., 2009, pp. 793-806).

Considerando sólo la leche cruda en el consumo como la fuente de un brote humano, básicamente tres microorganismos son frecuentes: *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* (Griffiths, 2010, pp. 36-39; Oliver et. al., 2005, pp. 115-129; Vogt et. al., 1990, p. 229). Para *Listeria monocytogenes* se han reportados, en relación con el consumo de leche cruda de vaca, diversos casos en diferentes partes del mundo (Claeys W. et. al., 2012, p. 252).

En cuanto al impacto en la salud pública, el desarrollo de una enfermedad después de consumir leche cruda contaminada depende una serie de factores, tales como la patogenicidad y número del microorganismo ingerido, la dosis a la que un ser humano se infecta, y la inmunidad del consumidor (D'Aoust, 1989 et. al. 2011, pp. 903-905). La presencia de patógenos transmitidos por los alimentos en la leche según una revisión de Oliver S. et. al. (2005, pp. 115-129), y ya que los brotes han sido relacionados con el consumo de leche no pasteurizada, se debe a varias razones:

- Defensores del consumo de leche cruda
- Consumo cruda por una fracción significativa de la población a través de sus derivados
- Microorganismos patógenos mediante leche cruda contaminada en plantas de procesamiento de alimentos lácteos, creando resistencia de estos microorganismos.
- La pasteurización o pasteurización ineficiente no es suficientemente eficaz para eliminar todos los patógenos transmitidos por la leche.

Es así que, los agentes patógenos como *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir y prosperar en la post-pasteurización el procesamiento de los entornos, lo que conduce a una nueva contaminación de los productos lácteos. Estas vías suponen un riesgo para los consumidores de la exposición directa a los patógenos transmitidos por los alimentos presentes en los productos lácteos sin pasteurizar, así como los productos lácteos productos que vuelvan a contaminarse después de la pasteurización.

### **1.11 Efecto del calentamiento de la leche en los patógenos que pueden encontrarse en la leche cruda de vaca**

El riesgo que representa el consumo de leche cruda se reduce considerablemente incluso hasta se elimina mediante un tratamiento térmico. Sobre la base de las condiciones de temperatura y tiempo aplicados, diferentes tratamientos de calor pueden distinguirse, como termización, pasteurización y esterilización, incluyendo UHT (ultra alta temperatura) y el ISI (innovador inyección de vapor) de tratamiento, destinado a diferentes dianas microbianas y resultando en una vida útil diferente de la leche. (Claeys et. al., 2012, pp. 253-254)

Un pre-tratamiento sólo para extender la vida útil de la leche enfriada es la termización (57-68 °C/15-20 segundos), sin embargo reduce de la microbiota vegetativa (por ejemplo, *Micrococcus*, *Coliformes*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, etc.) (Claeys et. al., 2012, p. 254), pero no garantiza la inactivación de todos los patógenos. Ahora bien, una pasteurización correcta (por ejemplo 71-74 °C / 15-40 segundos para HTST) elimina todos los microorganismos vegetativos presentes en la leche, incluyendo patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *C. jejuni/coli*, la producción de enterotoxina *S. aureus* y *Clostridium botulinum* vegetativo. (Claeys et. al., 2012, p. 254), pero no las enterotoxinas resistentes al calor de *Staphylococcus aureus*, la toxina botulínica, y las toxinas eméticas de *Bacillus cereus*, lo más aceptable sería manejar calidad en la producción, de manera que se evite la contaminación de este tipo.

## CAPITULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Muestreo

Las muestras fueron tomadas de la población total de mercados populares en Riobamba donde existen puestos de venta de leche cruda. En un termo con hielo se transportaron en recipientes estériles y cerrados lo más herméticamente posible una pequeña cantidad de leche de cada uno de los puntos de venta de dichos mercados, y de acuerdo a la variación de la expensa en un intervalo de tiempo de 9:00 hasta las 11:00 horas, tiempo estimado para encontrar el total o mayor número de vendedores de leche cruda y hasta las 12:00 para trasladar las muestras al laboratorio.

#### 2.2 Cultivo y cuantificación

Se utilizó el método de agotamiento en medio selectivo Farrell, dejando temperar las muestras a luego se sembró leche directamente con un asa calibrada a 0.5µl y se dejó 24 horas a 35°C, (Farrell y Robinson, 1972, pp. 11-15), se dejó madurar las colonias por 48 horas más a esta misma temperatura. Se cuantificó la cantidad bacterias aerobias heterótrofas presentes en cada muestra cultivada

#### 2.3 Aislamiento y purificación

Se utilizó el método de siembra por estría en placa en agar Mueller Hinton, aislamiento propiamente dicho y observación según Tortora (2007, pp. 69-70) con un asa calibrada de 0.5µl, separando las colonias físicamente distintas (tamaño, forma, color, entre otros), se corroboró con la prueba Gram,

#### 2.4. Identificación.

##### *2.4.1 Observación de la morfología de las bacterias encontradas*

En un portaobjeto se emulsionó una pequeña cantidad de colonias con solución salina 85% y se observó al microscopio óptico a lente 10X. La coloración rosada se tomó como Gran negativos y la coloración violeta como Gram positivos. (Tortora, 2007, pp. 69-70)

#### **2.4.2 Producción de catalasa**

En un portaobjeto con 1 gota de peróxido de hidrógeno se emulsionó una colonia, el burbujeo se tomó como positivo. (MacFaddin, 2003, p. 73)

#### **2.4.3 Producción de oxidasa**

Se tomó una tira reactiva marca Merck y se colocó una colonia, la coloración violeta intenso se tomó como positivo. (MacFaddin, 2003, p. 344)

#### **2.4.4 Oxidación/ Fermentación (O/F) por cultivo Hugh-Leifson**

Se preparó el medio de Hugh-Leifson y se inoculó una colonia en el medio bajo condiciones aerobias y anaerobias para ello se inoculó dos tubos; las condiciones anaerobias se dieron cubriendo uno de los tubos con parafina esterilizada y luego tapado, se incubó por 24 horas a 35°C, (MacFaddin, 2003, p. 354)

Si la coloración fue amarilla en el tubo abierto (sin parafina), se tomó como Oxidación. Se Reportó como O. Si la coloración fue amarilla o amarilla con presencia en ambos tubos, se tomó como Fermentación. Se Reportó como F. Si no hubo cambio en el color se tomó como “Ni oxidación ni fermentación” Se reportó NR. Si la coloración fue amarilla con presencia de gas en el tubo abierto y en el tubo sellado, se tomó como Oxidación y Fermentación. Se Reportó O/F. (MacFaddin, 2003, p. 359)

La presencia de gas se reportó como una prueba más en la Tabla 8-3. Para movilidad el crecimiento en forma de turbidez fuera de la zona de siembra se tomó como positivo. (MacFaddin, 2003, p. 306)

#### **2.4.5 Pruebas bioquímicas preliminares**

Se prepararon pruebas bioquímicas como son glucosa, citrato, urea y movilidad, se inocularon colonias y se incubaron por 48 horas a 35°C. Se consideró como positivo el cambio de coloración a saber: citrato a azul, urea a amarillo. (MacFaddin, 2003, pp. 92-397)

#### ***2.4.6 Hidrólisis de gelatina***

Se preparó agar gelatina, se inoculó colonias y se incubó por 6 días a 35 °C a estas condiciones la colonia creció lo suficiente, luego se cubrió esta colonia con una solución de cloruro mercúrico (MacFaddin, 2003, p.160) cuya preparación se indica a continuación;

Mezclar 12g de cloruro mercúrico en 80 mL de agua destilada y añadir lentamente 16 mL de ácido clorhídrico concentrado. (MacFaddin, 2003, p. 160)

#### ***2.4.7 Hidrólisis de almidón***

Se preparó agar almidón, se inoculó colonias y se incubó por 6 días a 35 °C a estas condiciones la colonia creció lo suficiente, luego se cubrió esta colonia con una yodo, la formación de un halo transparente (sin formación del complejo azul) se tomó como positivo. (MacFaddin, 2003, p.358)

#### ***2.4.8 Sistemas de pruebas múltiples API***

Para la determinación de género y especie según la metodología de MacFaddin (2003, p.433), para esta prueba los microorganismos fueron inoculados en agares de transporte para ser analizadas en Venezuela y México por el PhD Félix Andueza. Para el género Brúcela se utilizó sistema API20E-V4.0=021100411 con identidad de 92%.

#### ***2.4.9 Resistencia a derivados de los carbpenems***

Se inoculó las bacterias en agar Mueller Hinton mediante isopado completo y se colocó discos de antibióticos de meropenem e imipenem (antibióticos), Se incubó a 35°C por 24 horas. (Cona, 2002, pp. S77-S79). Todas las pruebas se realizaron con bacterias de 24 horas de crecimiento.

### **2.5 Otros datos**

Se utilizó para el efecto una cámara de flujo laminar marca NUAIRE Class II type B3, estufa MEMMERT y un esterilizador automático TUTTNAUER 2340MK, microscopio OLIMPUS C3C31 del Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Se usará la normativa ecuatoriana que se detalla en la justificación para leche cruda en la que declara la ausencia de microorganismos patógenos. (NTE INEN 9, 2012, p. 1)

## CAPITULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 Análisis, interpretación y discusión de resultados

Si observamos con atención la Tabla 1-3 podemos observar que el crecimiento bacteriano obtenido en el muestreo 1 (Gráfico 1-3) fue en la totalidad de las muestras, mientras que en el muestreo 2 (Gráfico 2-3) la cantidad de colonias para 3 muestras fue de cero, se estimaba que estos cambios bruscos se deben a que hubo contaminación que pudo provenir de sustancias añadidas como agua (Sinton, 2010, pp. 346), o de cantaras o manos que no se lavaron adecuadamente, así como cualquier tipo de mala práctica durante la cadena de producción, así como también bacterias causantes de la mastitis y de la piel provenientes de los animales. (Magariños, 2000, p. 17) se puede resaltar también que la cantidad de bacterias de San Alfonso (Tabla 1-3) se mantiene relativamente invariable a excepción de Puesto 2, lo que podría descartar la contaminación durante el transporte, la siembra y la incubación.

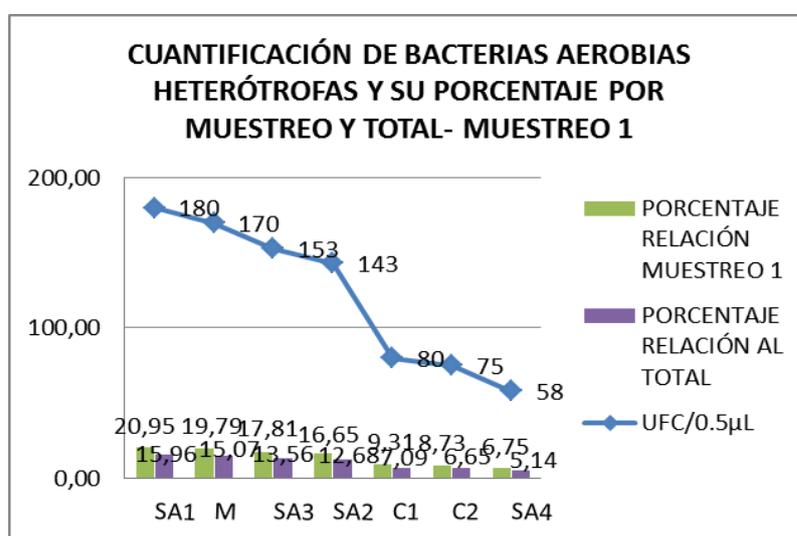
La Norma NTE INEN 9. Leche cruda. Requisitos establece que la leche cruda debe cumplir con un recuento de microorganismos aeróbios mesófilos no mayor a  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL, y el recuento obtenido en el presente trabajo llega a un valor de máximo  $3,60 \times 10^5$  UFC/mL; sin embargo, esta misma norma declara que la leche cruda para consumo debe tener ausencia de bacterias patógenas, es así que en las muestras analizadas se encontraron también bacterias patógenas, por lo que en primera instancia se tendría que afirmar que la leche cruda de los mercados populares no cumple con este requisito.

**Tabla 1-3:** Cuantificación de bacterias aerobias heterótrofas y su porcentaje por muestreo y total

MUESTREO 1					
PUESTO DE VENTA	CÓDIGO	UFC/0.5μL	Cant bacterias/mL	PORCENTAJE RELACIÓN MUESTREO 1	PORCENTAJE RELACIÓN AL TOTAL
San Alfonso 1	SA1	180	3,60E+05	20,95	15,96
Mayorista	M	170	3,40E+05	19,79	15,07
San Alfonso 3	SA3	153	3,06E+05	17,81	13,56
San Alfonso 2	SA2	143	2,86E+05	16,65	12,68
Condamine 1	C1	80	1,60E+05	9,31	7,09
Condamine 2	C2	75	1,50E+05	8,73	6,65
San Alfonso 4	SA4	58	1,16E+05	6,75	5,14
<b>TOTAL</b>		<b>859</b>			

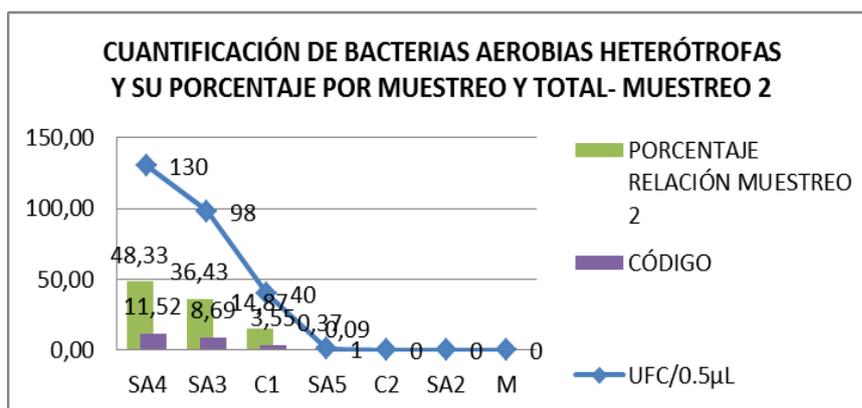
MUESTREO 2					
PUESTO DE VENTA	CÓDIGO	UFC/0.5μL	Cant bacterias/mL	PORCENTAJE RELACIÓN MUESTREO 2	PORCENTAJE RELACIÓN AL TOTAL
San Alfonso 4	SA4	130	2,60E+05	48,33	11,52
San Alfonso 3	SA3	98	1,96E+05	36,43	8,69
Condamine 1	C1	40	8,00E+04	14,87	3,55
San Alfonso 5	SA5	1	2,00E+03	0,37	0,09
Condamine 2	C2	0	0	0,00	0,00
San Alfonso 2	SA2	0	0	0,00	0,00
Mayorista	M	0	0	0,00	0,00
<b>TOTAL</b>		<b>269</b>			
<b>TOTAL BACTERIAS</b>			<b>1128</b>		

Realizado por: Lourdes Abad, 2015



**Gráfico 1-3:** Cuantificación de bacterias aerobias heterótrofas y su porcentaje por muestreo y total-Muestreo 1

Realizado por: Lourdes Abad, 2015



**Gráfico 2-3:** Cuantificación de bacterias aerobias heterótrofas y su porcentaje por muestreo y total-Muestreo 2

Realizado por: Lourdes Abad, 2015

Robinson (2002, pp. 110-112), explica que la leche puede ser fácilmente contaminada con bacterias Gram negativas sobre todo de la familia *Enterobacteriaceae*, o *Pseudomonadaceae*, así como

otras bacteria como las del género *Bacillus* spp., *Aeromonas* spp., por esto es importante exponer la cantidad de bacterias Gram negativas con relación a las Gram positivas, que es un indicativo preliminar de que se tiene bacterias patógenas, lo que es bastante significativo en el presente trabajo ya que 84,38% de las bacterias es Gram Negativa (Tabla 2-3) con relación al total de muestreos.

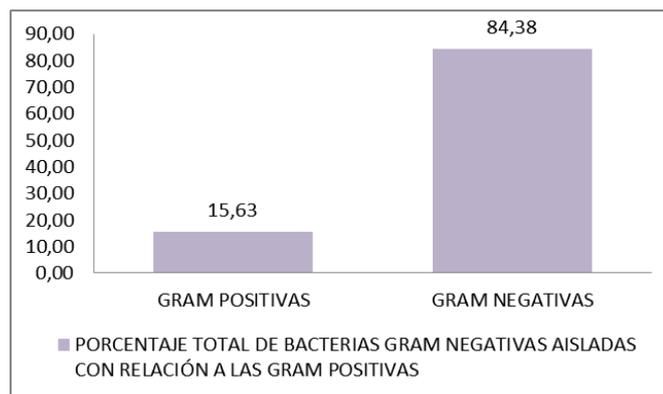
**Tabla 2-3: Cantidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, porcentaje por muestreo y total**

MUESTREO	GRAM POSITIVOS	GRAM NEGATIVOS	TOTAL MUESTRAS	PORCENTAJE GRAN NEGATIVOS POR MUESTREO
MUESTREO 1	2	16	18	88,89
MUESTREO 2	3	11	14	73,33
TOTAL	5	27	32	
PORCENTAJE MUESTREO	9,38	34,38		
PORCENTAJE TOTAL	15,63	84,38		

Realizado por: Lourdes Abad, 2015

Por otro lado, las bacterias Gram negativas frecuentemente producen efectos fisiopatológicos, debido a que en la membrana externa de su pared celular tienen en su composición lipopolisacáridos (LPS) también denominados endotoxina bacteriana que desencadenan respuesta inmune dándoles la capacidad patogénica (Mollinedo y González, 2014, pp. 2609-2613; Hernández, 2002, et. al., 2014, p. 63), por esto es que Gram es una prueba preliminar muy útil en el aislamiento e identificación final de microorganismos (Hernández, 2002, et. al., 2014, p. 63).

La prueba Gram también nos sirve como base para la aplicación de pruebas bioquímicas de sistemas múltiples API (MacFaddin, 2003, p. 92, 397) que es lo que se utilizó en este trabajo como una de las pruebas de identificación preliminar y que además no ha podido ser sustituida por ninguna otra; varios estudios se han hecho como el de Gregersen (1978, pp. 123-127), mediante KOH 3% que provoca lisis en las gram negativas haciendo que su suspensión se vuelva viscosa. Por esto podemos decir que la prueba Gram es de gran importancia para un estudio microbiológico.



**Gráfico 3-3:** Porcentaje de bacterias Gram negativas aisladas con relación a las Gram positivas.

**Realizado por:** Lourdes Abad, 2015

Analizados los resultados que se reportan en la Tabla 3-3 se concluye de manera inmediata que todas las leches recolectadas fueron consideradas de mala calidad microbiológica, aislándose en un 21.74% de bacterias patógenas como fue el caso de *Brucella* spp con relación a las muestras en total (Tabla 4-3), cuyas pruebas bioquímicas fueron confirmadas según James et. al. (1994, p. 96). Este género bacteriano se encontró en mayor porcentaje en el segundo muestreo (27.27%), de las cuales un 17.75% fueron del mercado san Alfonso, y 15.38% de Condamine (Tabla 6-3) esto con relación al resto de bacterias, sin embargo debemos tomar en cuenta que el número de muestras en San Alfonso es 4, en la Condamine 2 y en el Mayorista 1 (Tabla 5-3) para los dos muestreos; entonces se estima que la cantidad de cepas de *Brucella* spp. esta homogéneamente distribuida en todos los mercados, y que probablemente provienen del ganado de la provincia de Chimborazo infectado con Brucelosis (Eurídice, 1995, p. 359), con porcentajes de por muestreo 16.67% y 27.27% de para el Muestreo 1 y 2 (Tabla 3-3) respectivamente un porcentaje muy alto con relación al estudio hecho en ganado vacunado, por Eurídice (1995, p. 361)

De la misma manera, si observamos la Tabla 3-3, se presenta en mayor porcentaje *Aeromonas hidrófila* otra bacteria patógena causante de gastroenteritis (17.39%), por el lavado de cantaros con agua contaminada y que además no fueron bien higienizadas o bien hubo contaminación con personas infectadas (Li et. al., 2011, p. 160; Ghazi, 2011, p. 72), así mismo se hallaron algunas Enterobacterias como *Serratia plymuthica* (4.35%), *Enterobacter sakazakii* cuya identificación fue confirmada por su típico pigmento amarillo (Holt et. al., 1994, p. 601), *Escherichia coli* (4.35%), y bacterias del género *Bacillus* (27.27%), todas ellas bacterias patógenas oportunistas, posiblemente provenientes de adulterado con agua no tratada (Del Pilar et. al., 2005, p. 70) o las manos del ordeñador(Eurídice, 1995, p. 361),

Otras bacterias encontradas fueron *Burkodelia cepacia* (4.35%) bacteria que ha sido señalada como agente de mastitis por traumatismos o infecciones por falta de sanitización de las vacas

(Govan y Deretic, 1996, pp. 569-563), *Pseudomonas aeruginosa* de tierra o hierbas contaminadas en contacto con la leche por ordeño manual y en potreros (Ute et. al., 1997, pp. 386-404) y *Staphylococcus warneri* (4.35%) por posible contaminación de origen humano (Kamath et. al., 1992, p. 261); esto se explica debido a que en la región la producción puede no realizarse buenas prácticas de ordeño, mal manejo de la cría, y falta de implementación cadena de frío durante la cadena láctea. (Eurídice, 1995, p. 361)

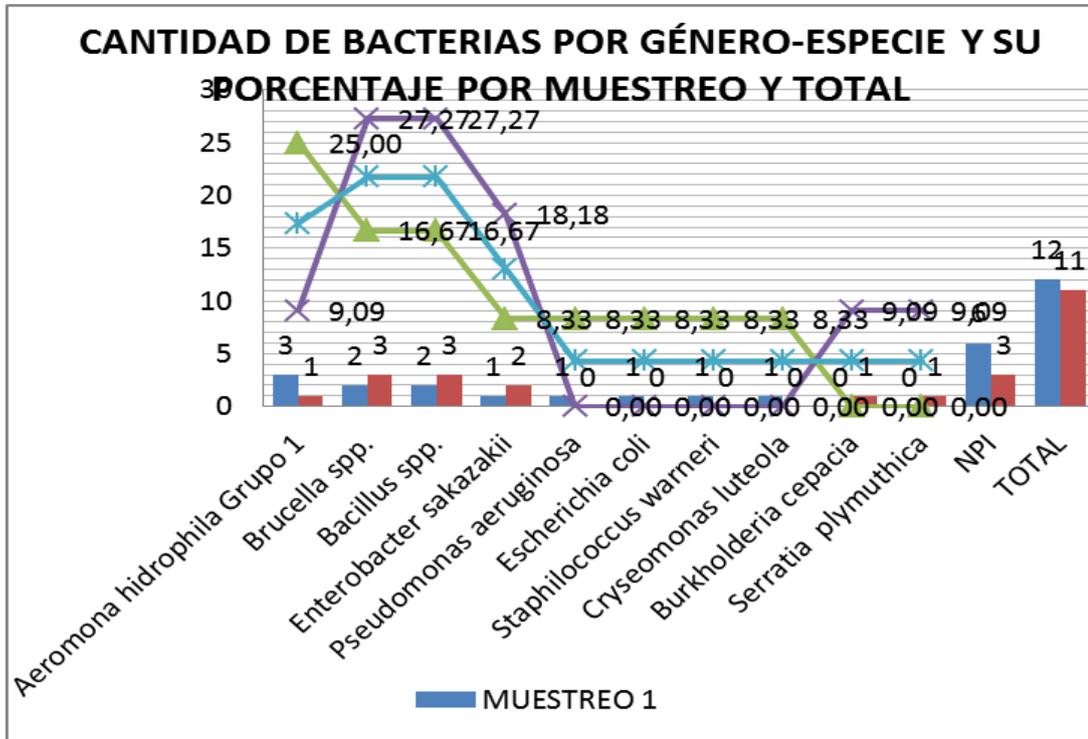
**Tabla 3-3:** Cantidad de bacterias por género-especie y su porcentaje por muestreo y total

BACTERIA	Nro DE BACTERIAS POR MUESTREO			PORCENTAJE POR MUESTREO		PORCENTAJE TOTAL
	MUESTREO 1	MUESTREO 2	Nro TOTAL	MUESTREO 1	MUESTREO 2	
<i>Aeromonas hidrophila</i> Grupo 1	3	1	4	25,00	9,09	17,39
<i>Brucella spp.</i>	2	3	5	16,67	27,27	21,74
<i>Bacillus spp.</i>	2	3	5	16,67	27,27	21,74
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	2	3	8,33	18,18	13,04
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0	1	8,33	0,00	4,35
<i>Escherichia coli</i>	1	0	1	8,33	0,00	4,35
<i>Stapyilococcus warneri</i>	1	0	1	8,33	0,00	4,35
<i>Cryseomonas luteola</i>	1	0	1	8,33	0,00	4,35
<i>Burkholderia cepacia</i>	0	1	1	0,00	9,09	4,35
<i>Serratia plymuthica</i>	0	1	1	0,00	9,09	4,35
NPI	6	3	9	50,00	27,27	39,13
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>23</b>			

Realizado por: Lourdes Abad, 2015

En el Gráfico 4-3, se puede notar el aumento marcado durante de muestreo 1 a 2 en los porcentajes de *Brucella spp.*, *Aeromonas hidrófila* y *Bacillus spp.* es decir la situación del consumo de la leche analizada es grave, ya que las 2 primeras bacterias justamente son las más patógenas encontradas, sobre todo *Brucella spp.*, cuya especie *Brucella abortus* causa una de las zoonosis más importantes a nivel mundial (Corbel, 1997, p. 213) este resultado es superior al del estudio realizado por Ayala y Tobar (2011, p. 50) en Tulcán provincia del Carchi. La otra bacteria, *Aeromonas* que es de origen humano, si personas que gustan de leche cruda o no hervida lo suficiente la toman, podrían contagiarse con enfermedades causadas por esta. (Li et. al., 2011, p. 160)

Todo esto podría hacer que varíen de manera negativa las incidencias y prevalencias de estas ETAs en la región. Por lo que se puede afirmar que la leche no es apta para consumo humano.



**Gráfico 4-3:** Cantidad de bacterias por género-especie y su porcentaje por muestreo y Total  
Realizado por: Lourdes Abad, 2015

**Tabla 4-3:** Cantidad de bacterias género *Brucella* y su porcentaje por muestreo y total con relación al resto de bacterias.

	MUESTREO	<i>Brucella spp.</i>	"OTRAS"
<b>Nro POR MUESTREO</b>	MUESTREO 1	2	10
	MUESTREO 2	3	8
<b>PORCENTAJE POR MUESTREO</b>	MUESTREO 1	16,67	83,33
	MUESTREO 2	27,27	72,73
	<b>PORCENTAJE TOTAL</b>	<b>21,74</b>	<b>78,26</b>
	<b>No TOTAL</b>	<b>5</b>	<b>18</b>

Realizado por: Lourdes Abad, 2015

**Tabla 5-3:** Cantidad de cepas de *Brucella spp.* con relación al número de cepas aisladas por muestreo en cada mercado y su porcentaje .

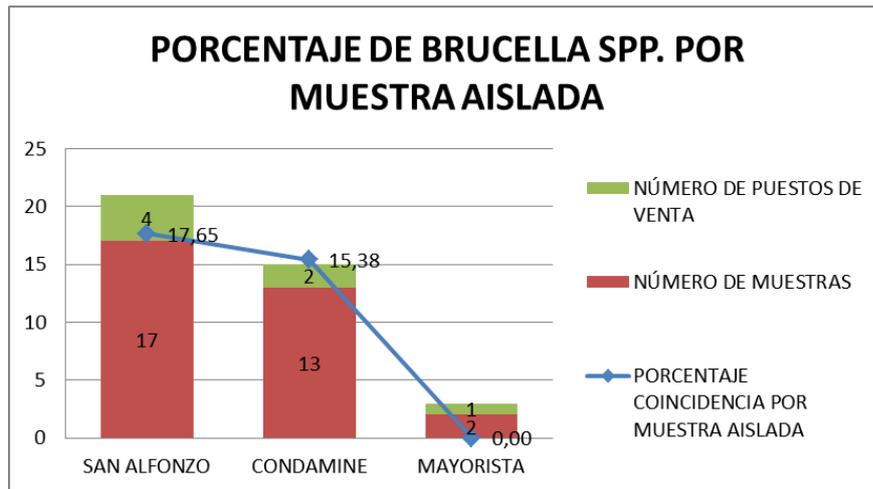
LUGAR	CANTIDAD CEPAS BRUCELLA SPP.	Nro MUESTRAS AISLADAS	Nro PUESTOS DE VENTA	PORCENTAJE POR MERCADO
SAN ALFONZO	3	17	4	17,65
CONDAMINE	2	13	2	15,38
MAYORISTA	0	2	1	0,00
<b>TOTAL</b>	<b>5</b>	<b>32</b>	<b>7</b>	

Realizado por: Lourdes Abad, 2015

**Tabla 6-3:** Genero-especies identificados en cada muestra aislada.

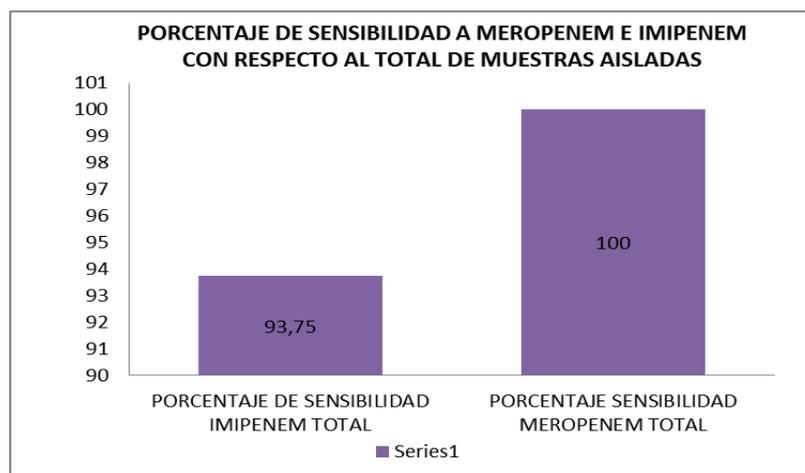
MUESTREO 1		
Nro	CÓDIGO	GENERO-ESPECIE
1	MA	NPI
2	MB	<i>Enterobacter sakazakii</i>
3	C1A	NPI
4	C1B	NPI
5	C2A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6	SA1A	<i>Brucella spp.</i>
7	C2B	<i>Aeromona hidrophila</i> Grupo 1
8	SA1C	NPI
9	SA2A	<i>Brucella spp.</i>
10	SA2B	<i>Aeromonas hidróphila/caviae</i>
11	SA4A	NPI
12	SA4B	<i>Escherichia coli</i>
13	SA1B	NPI
14	SA3B	<i>Staphilococcus warneri</i>
15	C1Cg	<i>Aeromonas hidróphila/caviae</i>
16	C1Cp	<i>Cryseomonas luteola</i>
17	SA3C	<i>Bacillus spp.</i>
18	SA3A	<i>Bacillus spp.</i>
MUESTREO 2		
Nro	CÓDIGO	GENERO-ESPECIE
1	C1A	<i>Enterobacter sakazakii</i>
2	C1B	<i>Bacillus spp.</i>
3	SA3A	<i>Enterobacter sakazakii</i>
4	SA3B	<i>Burkholderia cepacia</i>
5	SA3C	NPI
6	SA5g	<i>Serratia plymuthica</i>
8	SA4A1A	<i>Brucella spp.</i>
9	SA4A1Bg	<i>Aeromona hidrophila</i> Grupo 1
10	SA4A1Bp	<i>Bacillus spp.</i>
11	C2B1A	<i>Bacillus spp.</i>
12	C2B1B	NPI
13	C2CA1	<i>Brucella spp.</i>
14	C2CA2	NPI
15	C2CB	<i>Brucella spp.</i>

Realizado por: Lourdes Abad, 2015



**Gráfico 5-3:** Porcentaje de *Brucella* spp. por muestra aislada  
**Realizado por:** Lourdes Abad, 2015

Otros de los análisis realizados fue determinar algunos perfiles de susceptibilidad antimicrobiana. La prueba de resistencia a meropenem e imipenem dió resultados satisfactorios ya que las bacterias encontradas en su mayoría fueron sensibles en un 100% a meropenem, y en 93,75 a imipenem (Gráfico 7-3, Tabla 8-3), las bacterias resistentes a imipenem (tabla nro. 8) no se pudieron identificar sin embargo son bacilos Gram negativos provenientes del Puesto 1 de la Condamine, por lo que podemos decir que podrían tratarse de *Pseudomona* spp. (Patel et. al., 2015, pp.18-32; Hernández et. al., 2014, p.63), Familia *Enterobacteriaceae* y género *Acitenobacter*.(Patel et. al., 2015, pp.18-32), sin embargo *Pseudomona aeruginosa* fue encontrada sensible a imipenem ya que no produce mecanismos de resistencia con halos de inhibición de 28 a 32 mm. (Cejas et. al., 2008, p.242)



**Gráfico 7-3:** Porcentajes de sensibilidad a meropenem e imipenem con respecto al total de muestras aisladas  
**Realizado por:** Lourdes Abad, 2015

**Tabla Nro 8-3:** Características culturales, fisiológicas y bioquímicas de las cepas aisladas

MUESTREO 1		PRUEBAS PRELIMINARES			PRUEBAS BIOQUÍMICAS								RESISTENCIA	
Nro	CÓDIGO	GRAM	CATALASA	OXIDASA	O/F	CITRATO	ÚREA	MOVILIDAD	INDOL	GAS	GELTINA	ALMIDÓN	IMIPENEM	MEROPENEM
1	MA	B(-)	+	-	O/F	-	+	+	+	+	+	-	S	S
2	MB	B(-)	+	-	O/F	+	-	+	-	+	-	+	S	S
3	C1A	B(-)	+	-	O/F	-	+	+	-	+	-	+	R	S
4	C1B	B(-)	+	-	O/F	+	+	+	-	+	-	+	R	S
5	C2A	B(-)	+	+	O/F	-	+	+	-	-	-	+	S	S
6	SA1A	B(-)	+	+	O	-	+	-	-	-	-	-	S	S
7	C2B	B(-)	+	+	O/F	-	+	-	-	-	-	-	S	S
8	SA1C	B(-)	+	+	F	-	+	+	-	-	+	-	S	S
9	SA2A	B(-)	+	+	O	-	+	-	-	-	-	-	S	S
10	SA2B	B(-)	+	+	O/F	+	+	+	-	+	-	+	S	S
11	SA4A	B(-)	+	+	F	-	-	+	-	-	-	-	S	S
12	SA4B	B(-)	+	-	O/F	-	-	+	+	*	-	-	S	S
13	SA1B	B(-)	+	+	F	-	+	+	-	+	+	-	S	S
14	SA3B	C(+)	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	S	S
15	C1Cg	B(-)	+	+	O/F	+	+	+	-	+	-	+	S	S
16	C1Cp	B(-)	+	-	O/F	+	+	+	-	-	+	-	S	S
17	SA3C	B(-)	+	-	NR	-	+	+	-	-	+	-	S	S
18	SA3A	B(+)	+	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	+	-	-	S	S
MUESTREO 2		PRUEBAS PRELIMINARES			PRUEBAS BIOQUÍMICAS								RESISTENCIA	
1	C1A	B(-)	+	-	O/F	+	-	+	-	+	-	-	S	S
2	C1B	B(+)	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	+	-	S	S
3	SA3A	B(-)	+	+	O/F	-	-	-	-	-	-	-	S	S
4	SA3B	B(-)	+	+	O	+	+	+	-	-	+	-	S	S
5	SA3C	B(-)	+	+	O	+	+	+	-	-	+	-	S	S
6	SA5	B(-)	+	-	O/F	-	-	+	-	-	-	-	S	S
8	SA4A1A	B(-)	+	+	O	-	+	-	-	-	-	-	S	S
9	SA4A1Bg	B(-)	+	+	O/F	-	+	-	-	-	-	-	S	S
10	SA4A1Bp	B(+)	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	S	S
11	C2B1A	B(+)	-	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-	S	S
12	C2B1B	B(-)	-	+	O	+	+	-	-	-	+	+	S	S
13	C2CA1	B(-)	+	+	O	-	+	-	-	-	-	-	S	S
14	C2CA2	B(-)	-	+	O	-	-	+	-	-	+	+	S	S
15	C2CB	B(-)	+	+	O	-	+	-	-	-	-	-	S	S

Realizado por: Lourdes Abad, 2015

## CONCLUSIONES

La leche cruda analizada no cumple con la Norma Técnica Ecuatoriana 9. Leche cruda .Requisitos. ya que la presencia de bacterias patógenas nos sugiere calidad sanitaria deficiente, constituyendo un riesgo para la salud del consumidor.

En la leche cruda de los mercados populares de Riobamba existe una cantidad muy alta de cepas del género *Brucella* por lo que se podría afirmar que la incidencia y prevalencia en ganado bovino en la provincia de Chimborazo es también alta, y que están en peligro de contagio no solo el consumidor de la leche cruda vendida sino también el manipulador de este ganado.

La cantidad de bacterias patógenas encontradas en el presente trabajo, es alta por lo que se concluye que la leche cruda de los mercados populares de Riobamba tiene una calidad sanitaria deficiente, además existe poco o nulo uso de Buenas prácticas a lo largo de la cadena agroalimentaria de la leche expendida, constituyendo un grave problema de salud pública.

Es necesario el control y mejoramiento de sistemas de producción, transporte y almacenamiento de leche cruda a la venta, mediante capacitaciones y seguimiento durante toda la cadena láctea, implementados tanto las autoridades como el organismo regulador competente.

La mayoría de cepas aisladas fueron susceptibles a antibióticos derivados de lo carbapenemes, meropenem e imipenem, los casos resistentes encontrados fueron cepas aisladas del mercado La Condamine; se estima que se trata de algunas bacterias del género *Pseudomona*, Familia *Enterobacteriaceae* o género *Acitenobacter*.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar muestreo durante toda cadena láctea, de manera que se encuentre los lugares de mayor contaminación por *Brucella spp.*, o abarcando la mayor población posible, en el que se dé una visión clara de la calidad microbiológica de la leche en la provincia, tomando este estudio como base; además se podría realizar un estudio incidencia y prevalencia de brucelosis en la región, de manera que se relacione con la cantidad de patógenos encontrados y la enfermedades transmitidas por alimentos para encontrar si las personas desarrollaron inmunidad a tales bacterias patógenas..

Es necesario que se socialice de este proyecto, para que mediante los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo, y buscando apoyo y financiación de autoridades sanitarias locales, desplegar posibles soluciones. Una solución al problema es asociar a los productores, capacitarlos y vincularlos con la empresa láctea, de manera se produzca leche de calidad para luego ser pasteurizada, y vendida de manera inocua.

Se deben realizar capacitaciones generalizadas en buenas prácticas de manejo manipulación producción venta y almacenamiento a productores vendedores y consumidores de manera que se asegure el tratamiento adecuado de la leche desde la producción hasta el consumo, así como el acondicionamiento inmediato de las instalaciones de manera técnica para el almacenamiento y venta de productos alimenticios en los mercados populares de Riobamba, todo esto por parte de un profesional en el área.

## BIBLIOGRAFÍA

**AGURTO, G., FERNANDEZ, P.** *Prevalencia de brucelosis bovina en la Parroquia Ingapirca, Cantón Cañar, Provincia de Cañar* (Tesis pregrado, Médico veterinario Zootecnista) [en línea]. Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. 2013. pp. 68-117. [Consulta 24 Septiembre 2014]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/415/1/tesis.pdf>

**ANDERSSON, I., ÖSTE, R.** *Heat-induced changes in milk. Nutritional quality of heat processed liquid milk* [E-book]. 2<sup>da</sup> ed.. Bélgica. Editorial In P. F. Fox, 1995, pp. 279-307. [Consulta: 26 de Abril 2015]. ISSN 92-9098-017-9. Disponible en: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19950402665.html;jsessionid=6541078103DF25A1625F5D985A9138D2>

**ARRIETA L. E.** *Evaluación microbiológica de la leche y productos lácteos producidos en cuatro expendios de la zona metropolitana de Morelia* (Tesis pregrado, Médico veterinario Zootecnista). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Michoacan, México. 2011. p. 50. [Consulta 24 Septiembre 2014].

**ASTRUP, A. et al.** “Perspective: the role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010”. *American Journal of Clinical Nutrition* [en línea]. (2011), (United of States of America), 93(4), pp. 684-685. doi: 10.3945/ajcn.110.004622. [Consulta 24 Septiembre 2014]. Disponible en: <http://ajcn.nutrition.org/content/93/4/684.full.pdf+html>

**AYALA, E. A.; TOBAR, L. J.** *Incidencia de Brucelosis bovina (Brucella abortus) en los hatos lecheros de la Asociación Rancheros del Norte, Parroquia El Carmelo, Cantón Tulcán, Provincia del Carchi* (Tesis pregrado, Ingeniero en Desarrollo Integral Agropecuario) [en línea]. Universidad Politécnica Estatal del Carchi, Tulcán, Ecuador. 2014. p. 50. Disponible en: [http://181.198.77.140:8080/bitstream/123456789/35/1/171%20INCIDENCIA%20DE%20BRUCELOSIS%20BOVINA%20\(BRUCELLA%20ABORTUS\)%20EN%20LOS%20HATOS%20LECHEROS%20DE%20LA%20ASOCIACI%20C3%293N%20RANCHEROS%20DEL%20NORTE,%20PARROQUIA%20EL%20CARMENO%20-%20AYALA%20BECERRA,%20ERNESTO.pdf](http://181.198.77.140:8080/bitstream/123456789/35/1/171%20INCIDENCIA%20DE%20BRUCELOSIS%20BOVINA%20(BRUCELLA%20ABORTUS)%20EN%20LOS%20HATOS%20LECHEROS%20DE%20LA%20ASOCIACI%20C3%293N%20RANCHEROS%20DEL%20NORTE,%20PARROQUIA%20EL%20CARMENO%20-%20AYALA%20BECERRA,%20ERNESTO.pdf)

**BARRETT, N. J.** “Communicable disease associated with milk and dairy products in England and Wales”. *Journal of Infection* [en línea], (1986), (Gran Bretaña) 12(2). pp. 266-269

[Consulta 05 marzo 2014]. DOI: 10.1016/S0163-4453(86)94320-3. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445386943203>.

**CALDERÓN et. al.** “Evaluación de la calidad de leches en cuatro procesadoras de quesos en el Municipio de Montería”. Colombia. *Revista MVZ Córdoba* [en línea], (2007), (España) 12(1), pp. 912-920. [Consulta 01 Octubre 2015]. ISSN-e 1909-0544. Disponible en: <file:///C:/Users/DELL/Downloads/Dialnet-EvaluacionDeLaCalidadDeLechesEnCuatroProcesadorasD-3691492.pdf>

**CALDERÓN et. al.** “Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes Regiones de Colombia”. *Revista MVZ Córdoba* [en línea], (2006), (España) 11 (1), pp. 725-737 [Consulta 01 Octubre 2015]. ISSN 0122-0268. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682006000100006&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682006000100006&script=sci_arttext&tlng=pt)

**CALIFORNIA DEPT OF PUBLIC HEALTH, USA.** “Escherichia coli O157:H7 infections in children associated with raw milk and raw colostrums from cows e California”. *Morbidity and Mortality Weekly Report, Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* [en línea], (2006), (United States of America) 57(3), p. 625. PMID: 18551097. [Consulta 01 Octubre 2014]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18551097>

**CALLEJO A.** *Introducción a la anatomía de la ubre y la fisiología del ordeño*[en línea]. Open Course Ware, Universidad Politécnica de Madrid. 2015. [Consulta 01 Octubre 2015]. Disponible en: [http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordenomecanico/Tema\\_1.\\_Anatomia\\_y\\_Fisiologia](http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordenomecanico/Tema_1._Anatomia_y_Fisiologia)

**CEJAS D. et. al.** “Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en Pseudomonas aeruginosa aisladas en un hospital de Buenos Aires”. *Revista argentina de microbiología* [en línea], (2008), (Argentina) 40(4), p. 238.245. ISSN 1851-7617. [Consulta 01 Octubre 2014]. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-75412008000400012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-75412008000400012&script=sci_arttext)

**CLAEYS, W. L. et. al.** “Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*” [en línea], (2013), (Bélgica) 31(1), pp. 251-262. [Consulta 05 Marzo 2015]. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.035. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351200535X>

**CÓDIGO ALIMENTARIO ESPAÑOL.** Texto consolidado [en línea]. Presidencia de Gobierno. Madrid. (1967). España. [Consulta 23 Abril 2014]. Disponible en: [http://www.boe.es/diario\\_boe/txt.php?id=BOE-A-1967-16485](http://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-1967-16485)

**CONA E.** “Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar”. *Revista Chilena Infectología* [en línea]. (2002), (Chile) 19(2), pp. S77-S79. [Consulta 23 Abril 2014]. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v19s2/art01.pdf>

**CORBEL M. J.** “Brucellosis: an overview”. *Emergencing Infectious Disease* [en línea], (1997), (Israel) 3(2), p. 213–221. : DOI: 10.3201/eid0302.970219. [Consulta 23 Abril 2014]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627605/pdf/9204307.pdf>

**COVENIN 903-93.** *Leche cruda.* Comité técnico de Normalización CT10: Productos Alimenticios 1993 [en línea]. p. 1. [Consulta: 05 marzo 2015]. Disponible en: <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/903-93.pdf>

**D’Aoust, J. Y.** “Manufacture of dairy products from unpasteurized milk: a safety assessment”. *Journal of Food Protection* [en línea], (1989), (United States of America) 52(12), pp. 903-905. [Consulta 23 Abril 2014]. Disponible en: <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1989/00000052/00000012/art00013;jsessionid=16cn0q0avut84.alexandra#expand/collapse>

**DAVIS I. et. al.** “Situación actual y mejoramiento de la productividad de la ganadería Bovina de la pequeña Agricultura en Centro y Sudamérica”. *CENEREM-JICA*, Valdivia-Chile, 2003, p.48

**DEL PILAR et. al.** “Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua”. *Nova-Publicación Científica* [en línea], (2005), (Colombia) 3, pp. 1-116. ISSN: 1794-2470 [Consulta 05 marzo 2015]. Disponible en: <http://www.unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/47/92>  
Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00103a004>

**DOUGLAS, F., GREENBERG, R., & FARRELL, H. M.** Effects of ultra-high-temperature pasteurization on milk proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [en línea], (1981), (United States of America) 29(1), pp. 11-15. DOI: 10.1021/jf00103a004. [Consulta 07 marzo 2015].

**EBRINGER, L., FEREN\_CIK, M., & KRAJ\_COVI\_C, J.** (2008). “Beneficial health effects of milk and fermented dairy products e review”. *Folia Microbiológica*, 53, pp. 378-394

**EURÍDICE, A. et. al.** “Estudio de brucelosis a partir de muestras de leche de bovinos en el trópico subhúmedo del estado de Guerrero”. *Revista Veterinaria Mexicana* [en línea], (1995), (México) 26,(4), pp. 359-363. [Consulta 08 marzo 2015]. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/revvetmex/a1995/rvmv26n4/rvm26407.pdf>

**EUROPA, ESTADÍSTICAS Y SONDEOS.** *Annual production and utilisation of milk on the farm. Data* [en línea], (1995). (2013). Disponible en: <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/submitViewTableAction.do>

**FARRELL Y. y ROBINSON L.** In: *The Oxoid Manual of Culture Media, ingredients and other laboratory services*. 1982. Unipath, España S.A. pp. 11-15

**FLORES J. et. al.** *Evaluación de las características fisicoquímicas y Microbiológicas de leche entera y pasteurizada comercializada en diferentes lugares de la ciudad de San Miguel* (Tesis pregrado). Universidad de El Salvador, San Miguel, El Salvador. 2010. p. 81.

**FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** *Raw Milk & Pasteurized Milk* [en línea]. (2015). [Consulta 07 marzo 2015]. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/PopularTopics/ucm293042.htm>

**FRANDSON R., LEE L. & DEE A.** *Anatomy and Phisology of Farm animals*. Séptima edición. Colorado, United States of America. John Wiley & Sons, Inc., 2009. pp. 459-451

**GHAZI M. et. al.** “Survey of Aeromonas hydrophila in three marine fish species from north West Arabian Gulf, Iraq”. *Basrah J. Agric. Sci* [en línea], (2011), 23, (Iraq) 10(2). p. 72. [Consulta 08 marzo 2015]. Disponible en: <http://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&aId=55028>

**GOVAN J y DERETIC V.** “Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: fucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*”. *Microbiology and Molecular Reviews* [en línea]. (1996), (Escocia) 60(3), p. 539–574. ISSN: 0146-0749/96/\$04.0010 [Consulta: 01 Octubre 2015]. Disponible en: <http://mibr.asm.org/content/60/3/539.full.pdf+html>

**GREGERSEN T.** “Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria”. *European journal of applied microbiology and biotechnology* [en línea]. (1978). 5(2),

pp. 123-127. [Consulta: 01 Octubre 2015]. Disponible en:  
<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00498806>

**GRIFFITHS, M. W.** *Milk production and processing In Improving the safety and quality of milk*, Vol. 1 [E-book]. USA Guelph Woodhead Publishing Limited. 2010. pp. 36-39. [Consulta: julio 2015]. Disponible en:  
<https://books.google.com.ec/books?id=BpNwAgAAQBAJ&pg=PA56&dq=Milk+production+and+processing+In+Improving+the+safety+and+quality+of+milk+Griffiths++Griffiths&hl=es&sa=X&ved=0CBsQ6AEwAGoVChMIqa66u8-uyAIViBCQCh2N0AXA#v=onepage&q=Milk%20production%20and%20processing%20In%20Improving%20the%20safety%20and%20quality%20of%20milk%20Griffiths%20%20Griffiths&f=false>

**HARASIC O.; MARBAN R.** “National laboratories of meteorologist in the western Hemisphere”. *Quality progress XXXII* [en línea], (1999), (Hemisferio Western) 3(32), pp. 59-65. [Consulta: 01 Octubre 2015]. Disponible en:  
<http://search.proquest.com/openview/972f192b5a5873bf19f77029cf736e6b/1?pq-origsite=gscholar>

**HAUG, A., HØSTMARK, A., & HARSTAD, O.** “Bovine milk in human nutrition e a review”. *Lipids in Health and Disease* [en línea], (2007), (United States of América) 6(25), pp. 69-65. doi:10.1186/1476-511X-6-25. [Consulta: 01 Octubre 2015]. Disponible en:  
<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1476-511X-6-25.pdf>

**HERNANDEZ F.** *Fundamentos de Epidemiología: El arte detectivesco de la Investigación Epidemiologica* [E-book], San José-Costa Rica. EUMED. 2002, p. 63. [Consulta: 01 Octubre 2015]. Disponible en:  
[https://books.google.es/books?id=vu7xOb6X\\_qkC&pg=PA64&dq=gram+negativos&hl=es&sa=X&ei=zWYUVIasCoTgsATG3YCYBw#v=onepage&q=gram%20negativos&f=false](https://books.google.es/books?id=vu7xOb6X_qkC&pg=PA64&dq=gram+negativos&hl=es&sa=X&ei=zWYUVIasCoTgsATG3YCYBw#v=onepage&q=gram%20negativos&f=false)

**HOLT J. et. al.** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Parte B.* 9<sup>na</sup> ed. Baltimore-Maryland Lippincott Williams & Wilkins, 1994, p. 96

**JAMES T. et. al.** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Volúmen Dos, Parte B.* 2<sup>da</sup> ed. Baltimore-Maryland Williams & Wilkins, 1994, p. 601

**JARAMILLO V. Y YEPEZ C.** *Determinación de seroprevalencia de brucelosis bovina en la provincia de Pastaza y posibles factores de riesgo asociados con la enfermedad* (Trabajo de Grado, Médico Veterinario Y Zootecnista). Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. 2013. pp. 44-51

**JENSEN, R.** “Invited review: the composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000”. *Journal of Dairy Science*, (2002), 85, pp. 295-350.

**KAMATH U. et. al.** “Clinical Significance of *Staphylococcus warneri* Bacteremia”. *Journal of Clinical Microbiology* [en línea], (1992), (United States of América) 30(2), p. 261-264. ISSN: 0095-1137/92/020261-04\$02.00/0. [Consulta: 01 Octubre 2015]. Disponible en:

**LI M. et. al.** “Development of an *Aeromonas hydrophila* infection model using the protozoan *Tetrahymena thermophile*”. *FEMS Microbiol Lett* [en línea], (2011), 316(2), pp.160-160. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02208.x> [Consulta: 08 Marzo 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204941>

**LOSA, et. al.** “Evaluación de la utilidad de la tinción del Gram del esputo para el manejo de la neumonía en urgencias”. *Revista de la Sociedad Española de Medicina de Urgencias y Emergencias* [en línea], (2011), (España) 23(2), p.108-111. ISSN 1137-6821, [Consulta: 08 Marzo 2015]. Disponible en:

**MACFADDIN J.** *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3<sup>ra</sup> ed. Montevideo-Uruguay Editorial Médica Panamericana S.A, 2003, pp. 73-436

**MAGARIÑOS H.** *Producción higiénica de Leche. Volumen 6* [pdf en línea]. Valdivia Producción y Servicios Incorporados S.A. 2001. pp. 14-23. [Consulta: 06 Julio 2015]. Disponible en: <http://portal.oas.org/LinkClick.aspx?fileticket=wlyuTwr3IEc%3D&tabid=585>

**MARISCAL et. al.** “Características Microbiológicas de Leche Cruda de Vaca en Mercados de Abasto de Trinidad Bolivia”. *Revista Científica Agropecuaria Amazonas* [en línea], (2013), (Bolivia) 1(2), pp. 18-23. ISSN 2307-9606. [Consulta: 06 Julio 2015]. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2307-96062013000200002&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2307-96062013000200002&script=sci_arttext&tlng=pt).

**MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA, ACUACULTURA Y PESCA.** Programas y servicios [en línea]. [Consulta 07 marzo 2015]. Disponible en: <http://www.agricultura.gob.ec/programas-y-servicios/>

**MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA.** Anuario de Vigilancia epidemiológica [en línea]. Ecuador. 2010. [Consulta 07 marzo 2015]. Disponible en: <http://www.salud.gob.ec>

**MOLLINEDO M. Y GONZALEZ C.** Bacterias Gram negativas. *Revista de Actualización Clínica Investiga* [en línea], (2014), 49, pp. 2609-2613. ISSN 2304-3768. [Consulta: 01 octubre 2015]. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v49/v49\\_a05.pdf](http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v49/v49_a05.pdf)

**MOTARJEMI Yasmine, Moy Gerald & Todd Ewen.** *Encyclopedia of Food Safet Volumen 1.* Wyman Street, Waltham-USA, 2014, pp. 240

**MUÑOZ, A.** Los métodos cuantitativos y cualitativos en la evaluación de impactos en proyectos de inversión social (Tesis presentada para optar por el grado académico de Doctor en Ciencias de la Educación). Universidad Mariano Galvez. Guatemala. 2007. pp. 2-38

**NORMA TÉCNICA ECUATORIANA 0009.** *Leche cruda. Requisitos* [en línea], 2008. p. 3. [Consulta: 05 marzo 2015]. Disponible en: <http://www.normalizacion.gob.ec/>.

**NORMA TÉCNICA ECUATORIANA 12.** *Leche. Determinación del contenido de grasa* [en línea], 1973. p. 1. [Consulta: 05 marzo 2015]. Disponible en: <http://www.normalizacion.gob.ec/>

**NORMA TÉCNICA ECUATORIANA 30.** *Leche en polvo. Determinación de la grasa. Requisitos.* [en línea]. 1977. p. 4. [Consulta: 05 marzo 2015]. Obtenido de: <http://www.normalizacion.gob.ec/>.

**OLIVER, S. P. et. al.** “Food safety hazards associated with consumption of raw milk”. *Foodborne Pathogens and Disease* [en línea], (2009), 6(7), pp. 793-806. DOI:10.1089/fpd.2009.0302. [Consulta: 05 marzo 2015]. Disponible en: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2009.0302>

**OLIVER, S.P. et. al.** “Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications”. *Foodborne Pathogens and Disease* [en línea], (2005), 2(2). pp. 115-129. DOI:10.1089/fpd.2005.2.115. [Consulta: 05 marzo 2015]. Disponible en: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2005.2.115>

**ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA** *Producción de leche y huevos. Estadística* [en línea]. 2013. Disponible en: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/ess-yearbook2010/yearbook2010-production/es/>

**ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA.** *Milk Facts* [en línea]. 2013. Disponible en: <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/273893/>

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, CODEX ALIMENTARIUS.** *Codex general standard for the use of dairy terms* [en línea]. 2015. pp.206-1999. Normas oficiales. Disponible en: <http://www.codexalimentarius.org/codex-home/es/>

**PATEL J. B. et. al.** (2015). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-Fifth informational supplement CLSI. Volumen 35 No 3.* Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.2015. pp. 18-32

**ROBINSON R.** (2002). *Dairy Microbiology Handbook. The Microbiology of milk and product milk.* 3<sup>ra</sup> ed. New-York United States of America John Wiley and Sons, Inc. 2002. pp. 110-112

**ROMÁN S. et. al.** “Evaluación de la calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria de la leche cruda almacenada en frío”. *Revista Científica FCV-LUZ* [en línea], (2003), XIII (2), pp. 146-152. [Consulta: 08 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27925/2/articulo9.pdf>

**SANCHEZ M.** *Producción de leche en otros países. Producción Animal e Higiene Veterinaria.* [pdf en línea]. 2010. [Consulta: 08 noviembre 2014] Disponible en: [https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0CD0QFjAH&url=http%3A%2F%2Fwww.uco.es%2Fzootecniaygestion%2Fimg%2Fpictorex%2F30\\_11\\_25\\_tema\\_3.pdf&ei=h5FLVb-AI8O8ggS4wIHIAQ&usg=AFQjCNE-hdGKkOpgHntJMr9N-rDfTuclYQ&bvm=bv.92765956,d.eXY](https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0CD0QFjAH&url=http%3A%2F%2Fwww.uco.es%2Fzootecniaygestion%2Fimg%2Fpictorex%2F30_11_25_tema_3.pdf&ei=h5FLVb-AI8O8ggS4wIHIAQ&usg=AFQjCNE-hdGKkOpgHntJMr9N-rDfTuclYQ&bvm=bv.92765956,d.eXY)

**SCHAAF SMA, G.** “Effects of heat treatment on the nutritional value of milk”. *Bulletin of the International Dairy Federation*, (1989), 6, p. 238.

**SCHUCHAT, A., SWAMINATHAN, B., & BROOME, C. V.** “Epidemiology of human listeriosis. Review”. *Clinical Microbiology Reviews* [en línea], (1991), (United States of

America) 4(2), pp. 169-183. DOI: 10.1128/CMR.4.2.169. [Consulta: 08 agosto 2015].  
Disponible en: <http://www.reproduction-online.org/content/146/6/R191.full.pdf+html>

**SECRETARÍA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO (SENPLADES).**  
*Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017* [en línea]. 2013. Quito, Ecuador. [Consulta: 08 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.buenvivir.gob.ec/objetivo-3.-mejorar-la-calidad-de-vida-de-la-poblacion>

**SINTON L. et. al.** “Distinguishing human from animal fecal contamination in water: A review”. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* [en línea], (1998), 32, pp. 323-348). DOI:10.1080/00288330.1998.9516828. [Consulta: 08 agosto 2015]. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00288330.1998.9516828>

**SWAI, E. S., & SCHOONMAN, L.** “Microbial quality and associated health risks of raw milk marketed in the Tanga region of Tanzania”. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, (2011), 1(3), pp. 217-222. DOI:10.1016/S2221-1691(11)60030-0 . [Consulta: 05 marzo 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169111600300>

**TASSEW, A., & SEIFU, E.** “Microbial quality of raw cow's milk collected from farmers and dairy cooperatives in Bahir Dar Zuria and Mecha district”. *Ethiopia Agric Biol JN Am* [en línea], (2011) (Etiopía) 2(1), pp. 29-33. ISSN: 2151-7525 [Consulta: 05 marzo 2015]. Disponible en: <http://scihub.org/ABJNA/PDF/2011/1/ABJNA-2-1-29-33.pdf>

**TORTORA et. al.** *Introducción a la Microbiología*. 9<sup>n</sup> ed. Buenos Aires, Argentina Editorial Médica Panamericana, 2007, pp. 69-70

**UTE et. al.**” Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats”. *Journal of Molecular Biology* [en línea], (1997). (Suecia) 271(3), pp. 386–404. DOI:10.1006/jmbi.1997.1186 [Consulta: 08 julio 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283697911864>

**VARGAS T.** *Calidad de la leche: Visión de la industria láctea*. Fundación INLACA; UCV. X Congreso Venezolano de Zootecnia. Guanare [en línea], 2000, Conferencia: 297-302. [Consulta: 08 julio 2015]. Disponible en: [http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/xcongreso/P297\\_CalidadLeche.pdf](http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/xcongreso/P297_CalidadLeche.pdf).

**VOGT, R. L.et. al.** (1990). "Linking environmental and human strains of *Listeria monocytogenes* with isoenzyme and ribosomal RNA typing". *European Journal of Epidemiology* [en línea], (1990), 6(2), pp. 229-230. [Consulta: 08 julio 2015]. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00145800?LI=true>

## ANEXOS

**Anexo A.** Lista de los microorganismos patógenos humanos potencialmente presentes en la leche cruda de vaca y de las fuentes de contaminación.

	Direct passage from the blood into the milk (systemic infection)	Mastitis (udder infection)	Faecal contamination (external contamination of the milk during or after milking)/contamination from skin	Environmental sources
<b>Pathogenic bacteria</b>				
<i>Salmonella</i> spp.	(x) ( <i>S. Dublin</i> )	(x)	x	x
<i>Brucella abortus</i>	x	(x)		x
<i>Mycobacterium bovis</i>	x		x	x
<i>Coxiella burnetii</i>	x		x	x
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> <sup>a</sup>	x		x	x
<i>Listeria monocytogenes</i>	x	x	x	x
Human pathogenic verocytotoxigenic <i>E. coli</i> <sup>b</sup>			x	x
<i>Campylobacter coli</i> and <i>jejuni</i>			x	x
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	(x)	(x)	x	x
Human pathogenic <i>Yersinia</i> <sup>c</sup>		x <sup>d</sup>	x	x
<i>Bacillus cereus</i> <sup>e</sup>				x
Enterotoxin producing <i>Staphylococcus aureus</i>		x		x
<i>Arcanobacter pyogenes</i>		x		x
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>		x		
<i>Leptospira</i>	x			x (Urine)
<b>Pathogenic viruses</b>				
Rift valley fever virus	x			
Viruses of the tick-borne encephalitis (TBE) complex (of which the Central European encephalitis virus)	x			
<b>Pathogenic parasites</b>				
<i>Cryptosporidium parvum</i>			x	x
<b>Microbial toxins</b>				
Type B toxins of <i>Clostridium botulinum</i>	x (Toxins)		x (Spores)	x (Spores)

(x) Rarely.

<sup>a</sup> Potentially zoonotic.

<sup>b</sup> Only certain strains of *E. coli* that are transferred by cattle, which contain a human-virulent combination of virulence factors and that are pathogenic to humans. Strains of the serotype O157:H7 are the most frequently reported, but strains of other serotypes can result in human cases as well (e.g. O26, O91, O103, O111, O121 and O145).

<sup>c</sup> *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* (Shwimmer et al., 2007). Only *Y. enterocolitica* biotypes 1b, 2, 3, 4 and 5 of are pathogenic to humans.

<sup>d</sup> Only *Y. pseudotuberculosis*.

<sup>e</sup> Diarrheal toxins from *B. cereus* could be produced in raw milk. *B. cereus* can also produce emetic toxins (cereulide), but they were never found in milk.

**Fuente:** Claeys W. et. al., 2012, p.253, Disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351200535X>

**Anexo B.** Evaluación del riesgo microbiano relativo asociado con el consumo de leche cruda.

**Evaluation of the relative microbial risk associated with raw milk consumption.**

Pathogen	Presence in dairy cattle farms in Belgium <sup>a</sup>	Presence in raw cow milk in Europe <sup>b</sup>	Indication of number of outbreaks after raw cow milk consumption in Europe and worldwide <sup>c</sup>
<i>Salmonella</i> spp.	Present	0–2.9%	5 (Europe) or 39 (world)
<i>Campylobacter jejuni and coli</i>	Present	0–6%	18 (Europe) or 39 (world)
Human pathogenic <i>E. coli</i>	Present	0–5.7%	13 (Europe) or 28 (world)
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>d</sup>	Present	2.2–10.2% <sup>d</sup>	0 (Europe) or 2 (world)

<sup>a</sup> Based on individual lab results and available research projects. In a recent study, a between-herd seroprevalence of 3.3% (1.51–5.09) was estimated based on *Salmonella* antibodies detected in bulk tank samples in the North of Belgium (Ribbens et al., 2010).

<sup>b</sup> Based on punctual studies reporting the frequency.

<sup>c</sup> Human outbreaks reported in literature between 1970 and 2010.

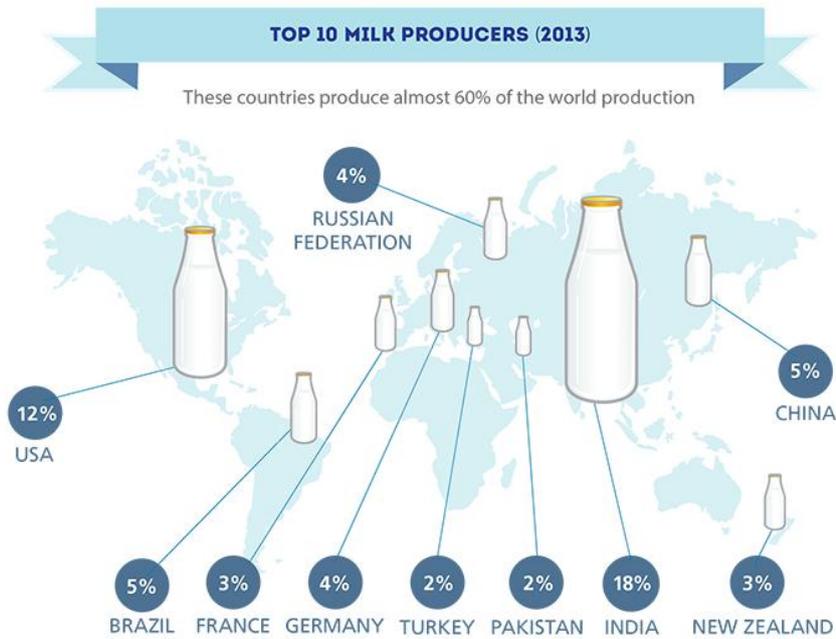
<sup>d</sup> Outliers: 0–0.6% (Switzerland, Bachmann & Spahr, 1995; Stephan & Bühler, 2002) and 45% (Spain, Domínguez Rodríguez et al., 1985).

<sup>e</sup> *L. monocytogenes* is frequently detected in raw milk, but its significance in terms of outbreaks due to raw cow milk consumption is very low.

**Fuente:** Claeys W. et. al., 2012, p.253.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351200535X>

**Anexo C. 10 países con mayor producción en el mundo. Tomado de FAO (2013)**

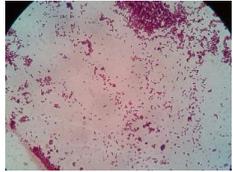


**Anexo D. Requisitos fisicoquímicos de la leche cruda. Tomado de Norma técnica ecuatoriana 9. Leche cruda. Requisitos**

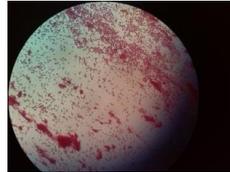
REQUISITOS	UNIDAD	MIN.	MAX.	MÉTODO DE ENSAYO
Densidad relativa: a 15 °C A 20 °C	-	1,029 1,028	1,033 1,032	NTE INEN 11
Materia grasa	% (fracción de masa) <sup>1</sup>	3,0	-	NTE INEN 12
Acidez titulable como ácido láctico	% (fracción de masa)	0,13	0,17	NTE INEN 13
Sólidos totales	% (fracción de masa)	11,2	-	NTE INEN 14
Sólidos no grasos	% (fracción de masa)	8,2	-	*
Cenizas	% (fracción de masa)	0,65	-	NTE INEN 14
Punto de congelación (punto crioscópico) **	°C °H	-0,536 -0,555	-0,512 -0,530	NTE INEN 15
Proteínas	% (fracción de masa)	2,9	-	NTE INEN 16
Ensayo de reductasa (azul de metileno)***	h	3	-	NTE INEN 018
Reacción de estabilidad proteica (prueba de alcohol)	Para leche destinada a pasterización: No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 68 % en peso o 75 % en volumen; y para la leche destinada a ultrapasterización: No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 71 % en peso o 78 % en volumen			NTE INEN 1500
Presencia de conservantes <sup>1)</sup>	-	Negativo		NTE INEN 1500
Presencia de neutralizantes <sup>2)</sup>	-	Negativo		NTE INEN 1500
Presencia de adulterantes <sup>3)</sup>	-	Negativo		NTE INEN 1500
Grasas vegetales	-	Negativo		NTE INEN 1500
Suero de Leche	-	Negativo		NTE INEN 2401
Prueba de Brucelosis	-	Negativo		Prueba de anillo PAL (Ring Test)
RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS <sup>5)</sup>	ug/l	----	MRL, establecidos en el CODEX Alimentarius CAC/MRL 2	Los establecidos en el compendio de métodos de análisis identificados como idóneos para respaldar los LMR del codex <sup>6)</sup>

**Anexo E.** Fotografías de la prueba Gram en las muestras aisladas

**Muestreo 1**



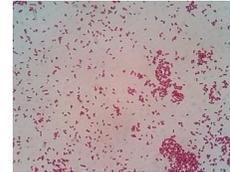
MA



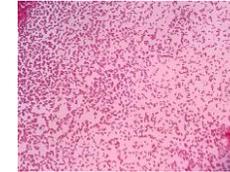
MB



C1A



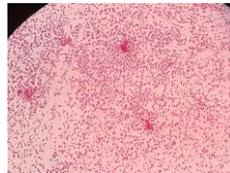
C1B



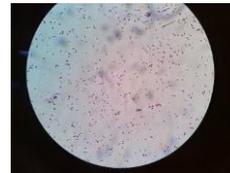
C2A



SA1A



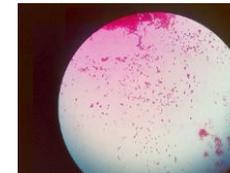
C2B



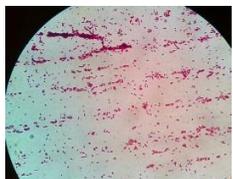
SA1C



SA2A



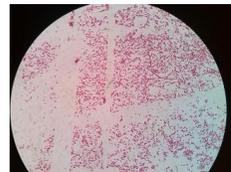
SA2B



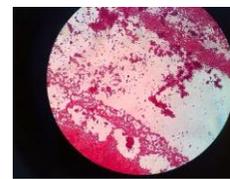
SA4A



SA4B



SA1B

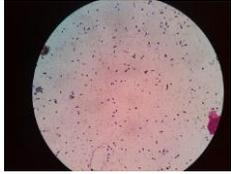


SA3B

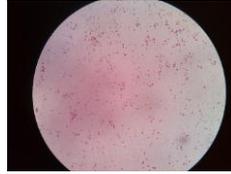


C1Cg

**Muestreo 2**



C1A



C1B



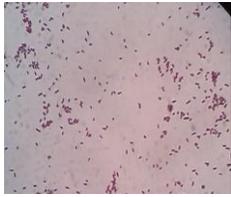
SA3A



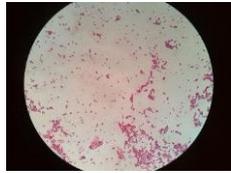
SA3B



SA3C



SA5g



SA4A1A

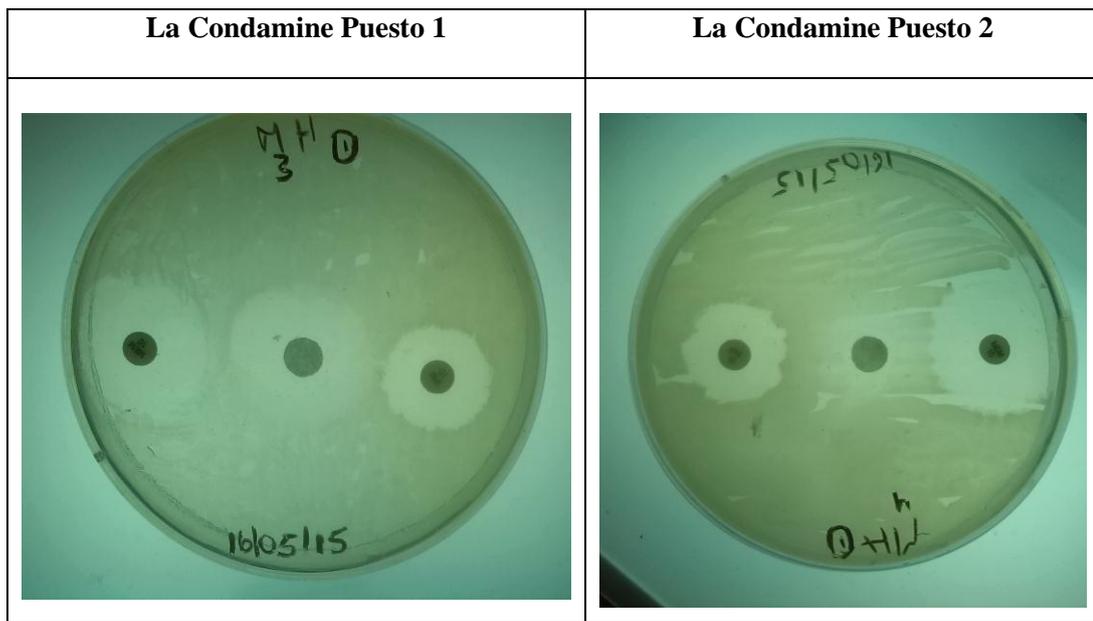


SA4A1Bg

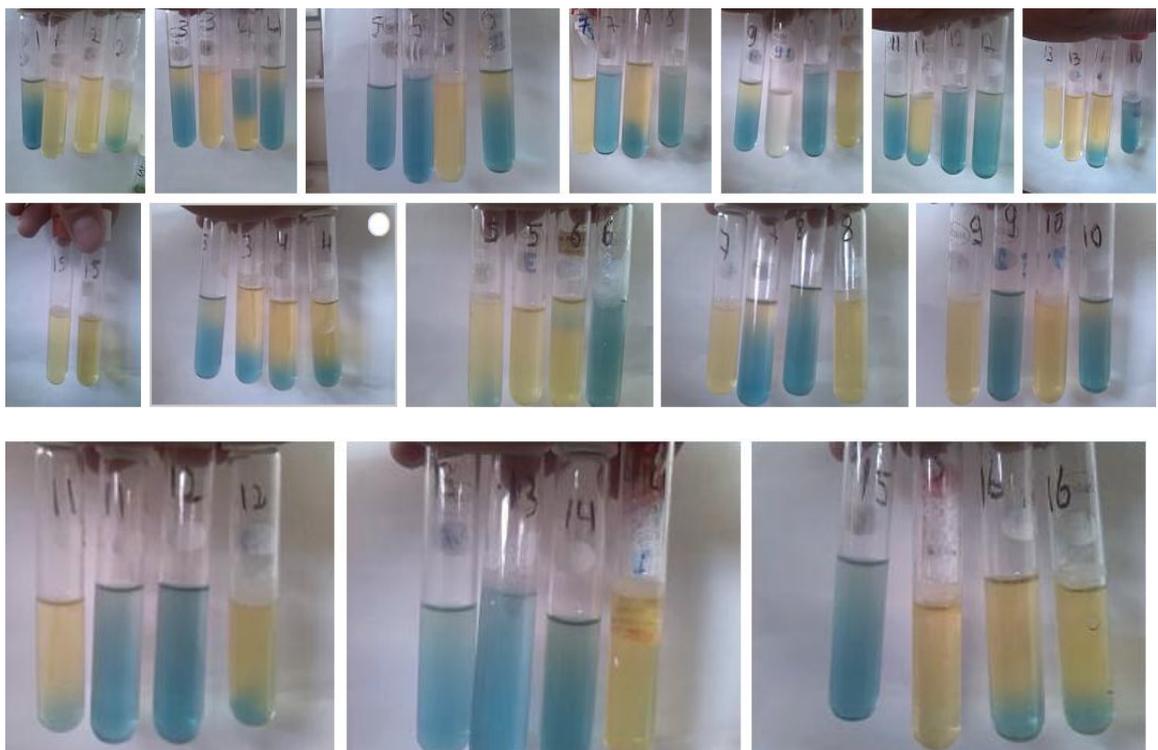


SA4A1Bp

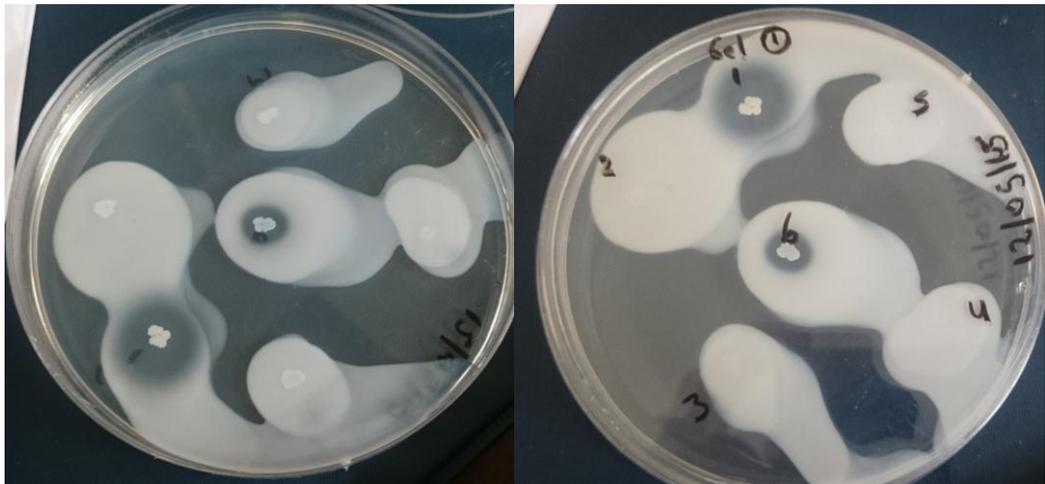
**Anexo F.** Fotografías de las dos cepas resistentes a imipenem



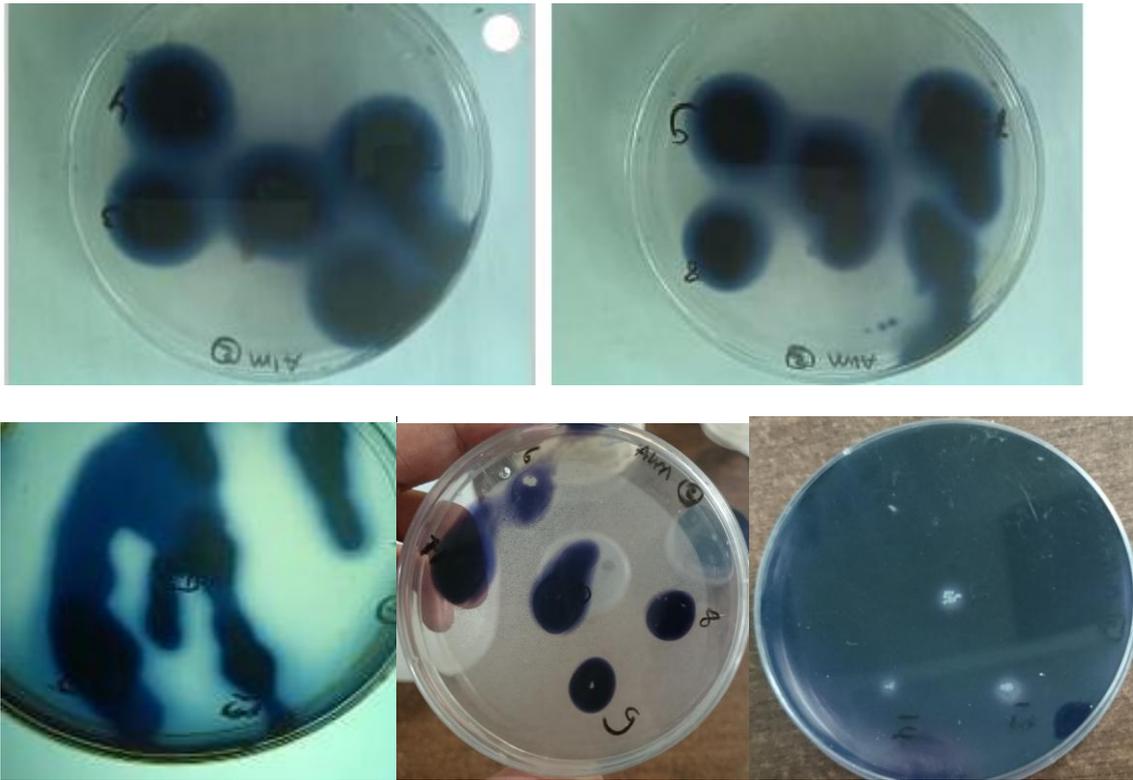
**Anexo G.** Fotografías de pruebas O/F, medio Hugh y Leifson



**Anexo H.** Fotografías de la prueba hidrólisis de gelatina



**Anexo I.** Fotografías de la prueba hidrólisis de almidón



**Anexo J.** Fotografías de algunos puestos de venta de leche cruda.

