

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



Implementación de un manual de ordeño higiénico en dos establecimientos lecheros y evaluación de su efectividad mediante análisis microbiológico en el departamento de Sonsonate, El Salvador.

POR:

MANUEL ERNESTO ALFARO RODRÍGUEZ

ANDREA GUADALUPE HURTARTE RODRÍGUEZ

RICARDO FRANCISCO VALLE HERNÁNDEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, 5 DE MAYO DE 2014.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



Implementación de un manual de ordeño higiénico en dos establecimientos lecheros y evaluación de su efectividad mediante análisis microbiológico en el departamento de Sonsonate, El Salvador.

POR:

MANUEL ERNESTO ALFARO RODRÍGUEZ

ANDREA GUADALUPE HURTARTE RODRÍGUEZ

RICARDO FRANCISCO VALLE HERNÁNDEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, 5 DE MAYO DE 2014.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA



Implementación de un manual de ordeño higiénico en dos establecimientos lecheros y evaluación de su efectividad mediante análisis microbiológico en el departamento de Sonsonate, El Salvador.

POR:

MANUEL ERNESTO ALFARO RODRÍGUEZ

ANDREA GUADALUPE HURTARTE RODRÍGUEZ

RICARDO FRANCISCO VALLE HERNÁNDEZ

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, 5 DE MAYO DE 2014

[Escribir texto]

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL:

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO:

ING.AGR. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA

SECRETARIO:

ING. AGR. MSc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA

MVZ. MARIA JOSE VARGAS ARTIGA

DOCENTES DIRECTORES

MVZ. OSCAR LUIS MELÉNDEZ CALDERÓN

LIC. MSc AMY ELIETH MORAN RODRÍGUEZ

MVZ. ROBERTO ENRIQUE CASTANEDA

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACION

MVZ. OSCAR LUIS MELÉNDEZ CALDERÓN

Resumen.

La leche cruda de vaca, ya sea que se utilice para consumo directo, o como materia prima para el procesamiento y comercialización de otros productos; requiere según las normas estatales, alcanzar ciertos estándares de inocuidad, posibles únicamente si su producción es de forma higiénica. Muchas prácticas se implementan en la actualidad en las salas de ordeño, para lograr tal fin; sin embargo el rubro de la producción láctea, carece de un método homogéneo para conseguir bajos niveles de recuentos bacterianos en leche.

En la actualidad, casi toda la leche producida es pasteurizada, eliminando así la mayor parte de microorganismos que pudieran contaminarla; sin embargo, hay cepas bacterianas resistentes a altas y bajas temperaturas. En nuestro país gran parte de la leche producida, proviene de explotaciones ganaderas de doble propósito; es comercializada de forma local sin intermediarios, y en las zonas rurales es consumida directamente después del ordeño, o utilizada para la manufactura de queso o crema, en condiciones que suelen ser insalubres o con poca atención a la higiene del personal, utensilios y de la misma ubre.

Observando esta realidad, es que se trazó el objetivo de estructurar un Manual de Ordeño Higiénico, y ponerlo en práctica, para probar su efectividad en dos establecimientos lecheros, ubicados en el departamento de Sonsonate. Se tomaron 72 muestras, entre ellas: manos (10), ubres (20), pezoneras (10) y leche (32); las cuales fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), de la Universidad de El Salvador. Las pruebas, sirvieron en primera instancia para evaluar la carga bacteriana de las superficies y la leche producida en tales establecimientos.

Luego se procedió a la implementación del método de ordeño higiénico seguido, de un nuevo muestreo de las mismas superficies y leche; corroborándose una disminución en la carga bacteriana. Esta comprobación, se realizó mediante el método estadístico no paramétrico de la prueba del signo, con un nivel de significancia del 0.05%. Los resultados ponen de manifiesto, que la aplicación de un método de ordeño higiénico, reduce la contaminación de las superficies en contacto con la leche durante la fase del ordeño y también la carga bacteriana, expresada en Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL), en la misma leche; asegurando así, la producción láctea, con un método higiénico de bajo costo y con un beneficio en la salud pública.

Agradecimientos.

Al concluir esta fase de nuestra educación superior no podemos evitar recordar a las personas que colaboraron en nuestra formación académica y nos permitieron alcanzar este punto; quisiéramos agradecer a nuestros docentes directores, sin los cuales este proyecto de tesis no hubiese visto la luz, gracias a: MVZ. Oscar Luis Meléndez Calderón, Lic. MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez y MVZ. Roberto Castaneda; su entusiasmo, experiencia y guía nos ayudó a dar forma al proyecto en sus inicios y su constante escrutinio y consejo nos permitió concluirlo de forma satisfactoria.

Asimismo debemos agradecer al Ing. Agr. Mario Bermúdez, cuya experiencia en el diseño de proyectos estadísticos nos facilitó la elección de un método apropiado para la naturaleza del estudio, además de apoyarnos en el correcto uso de la estadística no paramétrica.

Finalmente extendemos nuestra más sincera gratitud al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) por permitirnos desarrollar nuestra tesis de pregrado en sus instalaciones y por su valiosa y amablemente brindada ayuda.

Dedicatoria.

A nuestras familias, sin su apoyo constante durante nuestra vida no hubiésemos llegado a este punto de nuestras carreras.

A nuestros amigos que siempre nos recuerdan que aún en los momentos difíciles siempre hay tiempo para sonreír.

Manuel, Ricardo y Andrea.

Índice general.

| Contenido | Pág. |
|---|------|
| RESUMEN..... | iv |
| AGRADECIMIENTOS..... | v |
| DEDICATORIA..... | vi |
| ÍNDICE GENERAL..... | vii |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | ix |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS..... | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xii |
| ÍNDICE DE ANEXOS..... | xiii |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 2 |
| 2.1 Leche cruda..... | 2 |
| 2.2 Normativa..... | 3 |
| 2.3 Leche pasteurizada..... | 4 |
| 2.4 Buenas prácticas de producción lechera..... | 4 |
| 2.5 Ordeño..... | 5 |
| 2.6 Higiene previa al ordeño..... | 5 |
| 2.7 Método de ordeño higiénico..... | 7 |
| 2.8 Bacterias aerobias mesófilas..... | 9 |
| 2.9 Coliformes totales y fecales..... | 10 |
| 2.10 <i>Escherichia coli</i> | 12 |
| 2.11 Fuentes y causas de conteos bacterianos altos en leche cruda..... | 13 |
| 2.12 Contaminación bacteriana dentro de la ubre..... | 14 |
| 2.13 Contaminación bacteriana fuera de la ubre..... | 14 |
| 2.14 Medio ambiente..... | 15 |
| 2.15 Influencia de la limpieza del equipo y las prácticas de higiene..... | 16 |

| | |
|--|----|
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 17 |
| 3.1 Localización del estudio..... | 17 |
| 3.2 Descripción del estudio..... | 17 |
| 3.3 Metodología de campo..... | 18 |
| 3.3.1 Muestras de leche..... | 18 |
| 3.3.2 Muestras de manos..... | 19 |
| 3.3.3 Muestras de pezoneras..... | 19 |
| 3.3.4 Muestras de ubre..... | 19 |
| 3.4 Metodología de laboratorio..... | 19 |
| 3.4.1 Prueba presuntiva para coliformes totales..... | 19 |
| 3.4.2 Prueba confirmativa para coliformes totales..... | 20 |
| 3.4.3 Prueba confirmativa para coliformes fecales..... | 20 |
| 3.4.4 Recuento de bacterias aerobias mesófilas..... | 21 |
| 3.5 Metodología estadística..... | 21 |
| 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 22 |
| 4.1 Resultados en establecimiento lechero con ordeño manual..... | 22 |
| 4.2 Resultados en establecimiento lechero con ordeño mecánico..... | 28 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 34 |
| 6. RECOMENDACIONES..... | 35 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 36 |
| 8. ANEXOS..... | 38 |

ÍNDICE DE CUADROS.

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Requisitos microbiológicos y clasificación de la leche..... | 3 |
| Cuadro 2. Características físico químicas de la leche cruda..... | 3 |
| Cuadro 3. Período permisible para la pasteurización de la leche de acuerdo al nivel de producción o procesamiento..... | 4 |
| Cuadro 4: Promedios de recuentos de UFC en la prueba presuntiva de coliformes para muestras de manos, ubres y leche antes de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 22 |
| Cuadro 5: Promedios de recuentos de UFC en la prueba presuntiva de coliformes para muestras de manos, ubres y leche después de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 23 |
| Cuadro 6: Evaluación de muestras de manos mediante la prueba del signo..... | 23 |
| Cuadro 7: Evaluación de muestras de ubres mediante la prueba del signo..... | 24 |
| Cuadro 8: Evaluación de muestras de leche mediante la prueba del signo..... | 25 |
| Cuadro 9: Promedio de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) detectadas en recuento de bacterias mesófilas en muestras de leche antes de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 26 |
| Cuadro 10: Promedio de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) detectadas en recuento de bacterias mesófilas en muestras de leche después de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 26 |
| Cuadro 11: Evaluación de recuento de bacterias aerobias mesófilas por medio de la prueba del signo..... | 27 |
| Cuadro 12: Promedios de recuentos de UFC en la prueba presuntiva de coliformes para muestras de manos, ubres y leche antes de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 28 |

| | |
|---|----|
| Cuadro 13: Promedios de recuentos de UFC en la prueba presuntiva de coliformes para muestras de manos, ubres y leche después de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 29 |
| Cuadro 14: Evaluación de muestras de pezoneras mediante la prueba del signo..... | 29 |
| Cuadro 15: Evaluación de muestras de ubres mediante la prueba del signo..... | 30 |
| Cuadro 16: Evaluación de muestras de leche mediante la prueba del signo..... | 31 |
| Cuadro 17: Promedio de UFC detectadas en recuento de bacterias aerobias mesófilas en muestras de leche antes de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 32 |
| Cuadro 18: Promedio de UFC detectadas en recuento de bacterias aerobias mesófilas en muestras de leche después de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 33 |
| Cuadro 19: Evaluación de recuento de bacterias aerobias mesófilas por medio de la prueba del signo..... | 33 |

ÍNDICE DE GRAFICOS.

| | |
|---|---|
| Gráfico 1: Composición de la leche de vaca..... | 2 |
|---|---|

ÍNDICE DE FIGURAS.

| | |
|---|----|
| Figura 1: Diagrama método de ordeño higiénico..... | 6 |
| Figura 2: Microscopia electrónica de <i>Escherichia coli</i> | 10 |
| Figura 3: Formas de contagio y prevención de enfermedades causadas por <i>E. coli</i> | 13 |

ÍNDICE DE ANEXOS

Lista de cuadros.

| | |
|---|----|
| Cuadro A-1: Límites permisibles para coliformes totales y patógenos para muestras recolectadas por medio de enjuague..... | 38 |
| Cuadro A-2: Límites permisibles para coliformes totales y patógenos para muestras recolectadas por medio de hisopado..... | 38 |
| Cuadro A-3: Cantidad de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) detectadas en la prueba presuntiva de coliformes en muestra de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero manual, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 39 |
| Cuadro A-4: Cantidad de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) detectadas en la prueba presuntiva de coliformes en muestra de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero manual, después de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 39 |
| Cuadro A-5: Tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes totales en muestras de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero manual, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 40 |
| Cuadro A-6: Tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes totales en muestras de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero manual, después de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 40 |
| Cuadro A-7: Tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes fecales en muestras de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero manual, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 41 |
| Cuadro A-8: Tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes fecales en muestras de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero manual, después de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 41 |

| | |
|---|----|
| Cuadro A-9: Cantidad de tubos positivos en las pruebas confirmatorias de coliformes totales y fecales para muestras de manos, ubres y leche en establecimiento lechero manual; antes y después de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 42 |
| Cuadro A-10: Cantidad de UFC detectadas en recuento de bacterias aerobias mesófilas en muestras de leche, en el establecimiento lechero manual, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 42 |
| Cuadro A-11: Cantidad de UFC detectadas en recuento de bacterias aerobias mesófilas en muestras de leche, en el establecimiento lechero manual, después de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 42 |
| Cuadro A-12: Cantidad de UFC detectadas en la prueba presuntiva de coliformes en muestra de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero mecánico, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 43 |
| Cuadro A-13: Cantidad de UFC detectadas en la prueba presuntiva de coliformes en muestra de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero mecánico, después de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 43 |
| Cuadro A-14: Tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes totales en muestras de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero mecánico, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 44 |
| Cuadro A-15: Tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes totales en muestras de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero mecánico, después de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 44 |
| Cuadro A-16: Tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes fecales en muestras de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero mecánico, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 45 |
| Cuadro A-17: Tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes fecales en muestras de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero mecánico, después de la aplicación del método de ordeño higiénico..... | 45 |

Cuadro A-18: Cantidad de tubos positivos en las pruebas confirmatorias de coliformes totales y fecales para muestras de manos, ubres y leche en establecimiento lechero mecánico; antes y después de la aplicación del método de ordeño higiénico.....46

Cuadro A-19: Cantidad de UFC detectadas en recuento de bacterias aerobias mesófilas en muestras de leche, en el establecimiento lechero mecánico, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico.....46

Cuadro A-20: Cantidad de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) detectadas en recuento de bacterias aerobias mesófilas en muestras de leche, en el establecimiento lechero mecánico, después de la aplicación del método de ordeño higiénico.....46

Cuadro A-21: Valores críticos de Z.....47

Lista de figuras.

Figura A-1: Evaluación de rutina de ordeño.....48

Figura A-2: Supervisión método ordeño higienico.....48

Figura A-3: Tanque de acopio ganadería con ordeño mecánico.....48

Figura A-4: Muestreo de manos.....49

Figura A-5: Muestreo de pezoneras.....49

Figura A-6: Muestreo de ubres.....49

Figura A-7: Muestras transportadas en refrigeración.....50

Figura A-8: Diagrama prueba presuntiva.....50

Figura A-9: Muestras durante la incubación.....50

Figura A-10: Inoculación de tubos.....51

Figura A-11: Recuento de colonias.....51

Figura A-12: Recuento de colonias.....51

Figura A-13: Lectura de tubos positivos.....52

Figura A-14: Lectura de tubos positivos.....52

Lista de anexos.

Anexo A-1: Toma de muestras por el método del hisopado.....53

Anexo A-2: Toma de muestras por el método de enjuague.....53

Anexo A-3: Preparación de solución de agua peptonada al 1%.....54

Anexo A-4: Preparación de caldo bilis verde brillante.....55

Anexo A-5: Preparación de caldo EC.....55

Anexo A-6: Preparación de agar bilis rojo neutro cristal violeta.....55

Anexo A-7: Preparación de agar Plate Count.....55

Anexo A-8: Recuento de bacterias aerobias mesófilas.....55

Anexo A-9: Prueba presuntiva para la detección de coliformes.....56

Anexo A-10: Prueba confirmatoria de coliformes totales.....57

Anexo A-11: Prueba confirmatoria de coliformes fecales.....57

Anexo A -12: Manual de Ordeño Higiénico.....59

1. Introducción.

A nivel nacional, a finales del 2010, se calculó que la población bovina de hembras de más de dos años de edad, en etapa productiva, era de 685,469; para ese mismo año la producción láctea se estimó en 457,740 millones de litros. Un poco más del 70% del hato ganadero salvadoreño y su consecuente producción, que asciende hasta el 60% de la leche, se encuentra en condiciones de explotación de doble propósito, caracterizada por un manejo extensivo tradicional, con poco o ningún uso de tecnología y una práctica de ordeño parcialmente higiénica.

De acuerdo a lo expresado anteriormente, se puede inferir que gran parte de la leche fluida que se produce y comercializa en el país, proviene de hatos ganaderos, con pocas prácticas de higiene en los diferentes procesos que componen la producción láctea; más aún, podemos decir, que la leche por ser un alimento proclive a contaminarse durante su procesamiento, se convierte un riesgo potencial para la salud de la población si no es producida de acuerdo a normas de higiene establecidas.

A pesar de los controles impuestos por las autoridades sanitarias del país, las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's), siguen proliferando, principalmente en el ámbito de los subproductos lácteos preparados de forma artesanal; ya que generalmente estos productos no son elaborados bajo estrictas normas de higiene, y la materia prima no es manejada y almacenada en virtud de conservar sus propiedades. Las ETA's producidas por consumo de productos lácteos, son causadas por la contaminación de tales productos; ya sea en la sala de ordeño o la sala de procesamiento de productos lácteos. Observando tal situación, es de suma importancia estructurar una metodología de ordeño higiénico simple, efectiva y respaldada por análisis microbiológicos, que avalen su eficiencia; para asegurar la inocuidad de la leche durante la fase de extracción u ordeño, ya que es el primer momento en que la leche está expuesta a posibles agentes contaminantes. Partiendo de la hipótesis de que el ordeño debe realizarse con una técnica higiénica, para lograr bajos recuentos bacteriológicos y reducir la posibilidad de contaminación de la leche; se propuso un método de ordeño higiénico de fácil y rápida aplicación, el cual fue implementado durante un mes en cada establecimiento lechero y se evaluó a través de pruebas microbiológicas que revelaron su efectividad.

2. Revisión bibliográfica.

2.1 Leche cruda.

La leche cruda es la secreción mamaria normal de animales de producción láctea obtenida de uno o más ordeños sin adición o extracción a su composición, adquirida para consumo como fluido o procesamiento ulterior. (OMS, 2011). La leche ha constituido un alimento primordial para la humanidad desde hace 8,500 años y ha formado parte de la dieta humana en variadas formas: quesos, mantequilla, yogurt, helado, etc. (OMS, 2011); la leche, al servir como materia prima y fuente nutricional para la alimentación humana, debe cumplir con ciertos requisitos sanitarios obligatorios que cada país debe establecer como normativas obligatorias concernientes a mantener y proteger la salud de los habitantes y disminuir la incidencia de ETA's.

La leche es la única materia proporcionada por la naturaleza para servir exclusivamente como fuente de alimentación. Por lo tanto, un factor fundamental que influye en el valor y la aceptación universal de la leche es la imagen que ésta presenta: la de una posibilidad nutricional no superada por ningún otro alimento utilizado por el hombre. Las proteínas que contiene la leche son ideales, tanto por su calidad como por su equilibrada composición, para satisfacer las necesidades de aminoácidos del hombre. Su contenido de minerales y vitaminas es excepcional, no sólo en proporción, sino en calidad. Dejando aparte la vitamina C y el hierro, la leche puede considerarse como una fuente segura de nutrientes para el crecimiento y desarrollo de la población humana (Magariños, 2000: 85).

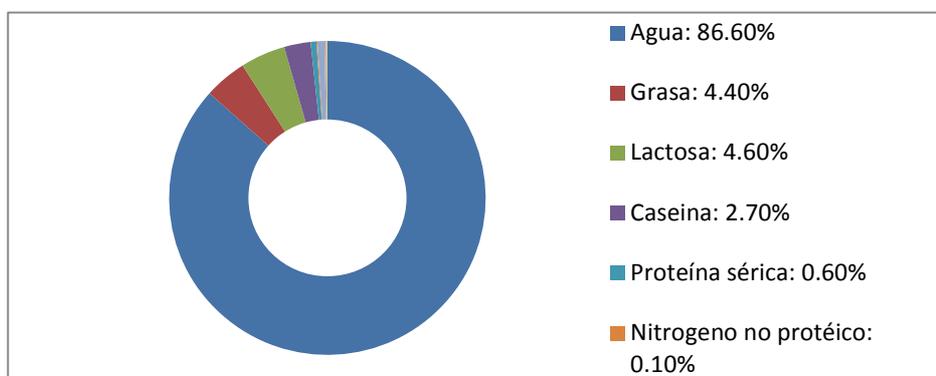


Gráfico 1: Composición de la leche de vaca.

2.2 Normativa.

La normativa está contemplada por los organismos de salud humana y animal de El Salvador, Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MINSAL), de manera que detalla en ella que la leche cruda de vaca, producida en las haciendas lecheras del país se clasificará en tres categorías de acuerdo a la cantidad de unidades formadoras de colonias de microorganismos aerobios mesófilos que contenga por mililitro.

Cuadro 1. Requisitos microbiológicos y clasificación de la leche.

| Clasificación Requisito | Grado A | Grado B | Grado C |
|-------------------------------|-------------------------|--|--|
| Recuento total de UFC por ml. | Menor o igual a 300,000 | Mayor de 300,000 y menor o igual a 600,000 | Mayor de 600,000 y menor o igual a 900,000 |

Tomado de NSO 67. 01. 01: 06 (CONACYT, 2006).

La Normativa Salvadoreña Obligatoria 67.01.01:06 establece también una serie de requerimientos físico químicos que la leche debe cumplir para venderse en el mercado nacional, tales características son consideradas como complementarias en la normativa, debido a que su importancia no radica de forma directa en la inocuidad del producto, sino más bien en su calidad y palatabilidad.

Cuadro 2. Características físico químicas de la leche cruda.

| Característica. | Valor. |
|---|-----------------------------|
| Acidez, ácido láctico % | 0.14-0.17 |
| Proteínas. | 3.2 (mínimo) |
| Cenizas % | 0.70. |
| TRAM. | |
| Grado A | 6 horas o más. |
| Grado B | 4 horas y menos de 6 horas. |
| Grado C | Menos de 4 horas. |
| Impurezas macroscópicas (sedimento) en 500ml. | |
| Grado A | 1.0 mg |
| Grado B | 2.0 mg |
| Grado C | 3.0 mg |
| Punto de congelación | -0.530 a -0.550 °C |
| Ph | 6.4-6.7 |
| Conteo de células somáticas por ml. | Máximo 750,000 |
| Densidad relativa (peso específico) | 1028-1033 a 15°C |

Tomado de NSO 67. 01. 01: 06 (CONACYT, 2006).

2.3 Leche pasteurizada.

La pasteurización de la leche de vaca es un requisito obligatorio para los procesadores que reciben la materia prima, así como también un requisito de las plantas productoras industriales y artesanales que según el Código de Salud debe acatarse de forma gradual y dependiendo de la cantidad de leche procesada o producida.

Cuadro 3. Período permisible para la pasteurización de la leche de acuerdo al nivel de producción o procesamiento.

| Cantidad de leche. | Periodo permisible. |
|--|----------------------------------|
| Más de 10,000 botellas al día. | 3 meses. |
| 5,001 a 10,000 botellas al día. | 6 meses. |
| 2,001 a 5,000 botellas al día. | 24 meses. |
| Menos de 2,000 botellas al día. | Productor/procesador artesanal.* |

Tomado de Asamblea Legislativa de la República de El Salvador (Código de Salud, 2001)

*Los productores y procesadores artesanales estarán exentos de la pasteurización pero deberán cumplir con los siguientes requisitos que garanticen la higiene del producto:

1. Obtener el registro de procesadores y productores artesanales de la Dirección General de Salud del MINSAL.
2. Asegurar que la leche producida y procesada provenga de hatos libres de Brucelosis y Tuberculosis o que participe en los programas sanitarios del MAG.
3. La leche debe provenir de hatos donde se practique el ordeño higiénico y que los operarios mantengan un registro actualizado de su cartilla de salud.
4. Para el procesamiento de la leche debe utilizarse equipos y utensilios de fácil limpieza y que aseguren la buena calidad higiénica del producto (Asamblea Legislativa República de El Salvador, 2001).

2.4 Buenas prácticas de producción lechera (BPPL).

Las BPPL consisten en una metodología enfocada al uso de técnicas que aseguren la inocuidad de un alimento mediante la puesta en práctica de una organización de acciones que cercioren la higiene de la manipulación de los equipos e insumos que intervienen en la producción de la

leche. Cada planta productora debe contemplar esta metodología según la normativa vigente, para asegurar la producción de leche inocua para la población salvadoreña. Las normativas consultadas son tajantes en cuanto a los requerimientos que debe cumplir el producto final, sin embargo fallan en proporcionar las herramientas para lograrlo por lo que los productores lácteos del país adecúan su metodología de ordeño con base a lo que las plantas procesadoras exigen y utilizan como método único y definitivo de higiene la pasteurización, proceso obligatorio de sanitización del producto final, sin prestar atención a las fallas de inocuidad que pueden existir en el proceso de producción (Rosa da Costa, 2009).

2.5 Ordeño.

El ordeño consiste en la extracción de la secreción láctea de la glándula mamaria bovina de forma continua, completa e higiénica; existen dos métodos de ordeño: manual y mecánico. El método manual consiste en la extracción de la leche mediante la presión ejercida de forma manual sobre el pezón de la vaca, desde arriba hacia abajo; la forma mecánica se fundamenta en la aplicación de vacío controlado y cíclico para la obtención de la leche (Ver Figura 1).

2.6 Higiene previa al ordeño.

La higiene en la fase previa al ordeño consiste en las medidas higiénicas que se toman para que el establecimiento de ordeño y la manipulación de la ubre durante éste, no constituyan un riesgo de contaminación (OIRSA, *et al.* 2007):

1. Uso de indumentaria adecuada.

1.1 Bata plástica limpia y seca.

1.2 Botas de hule limpias y secas.

1.3 Cofia o redecilla para el cabello.

1.4 Tapaboca.

2 Higiene personal y salud de los operarios.

2.1 Cabello y uñas cortas.

2.2 Certificado de salud que lo acredite libre de enfermedades infecciosas.

2.3 Ausencia de heridas en manos y brazos, así como limpieza y desinfección de manos.

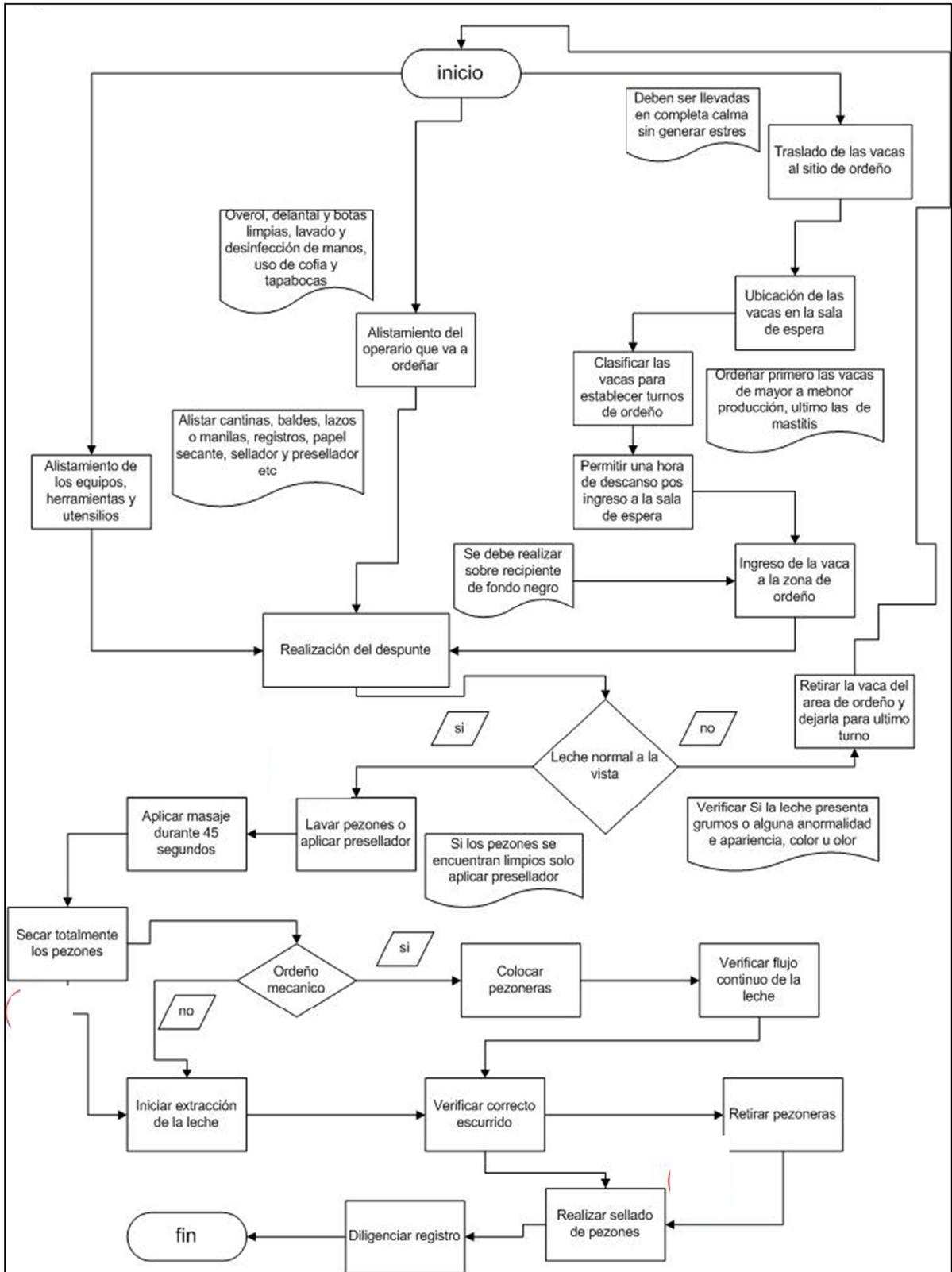


Figura 1: Diagrama método de ordeño higiénico.

3 Higiene de los utensilios.

3.1 Sala de ordeño limpia y seca.

3.2 Pezoneras limpias y secas (cubetas limpias en caso de ordeño manual).

2.7 Método de ordeño higiénico.

El método de ordeño higiénico busca evitar la contaminación de la leche durante el proceso de extracción, mediante una preparación y manipulación que asegura la desinfección de las superficies del pezón y el equipo (SAGARPA y SENASICA, 2009).

El lavado de los pezones, previo al ordeño, es un instrumento fundamental para reducir la contaminación microbiana de la leche. El agua empleada debe ser limpia y de ser posible con algún desinfectante, utilizando toallas desechables para el secado. Lavar con agua y paños reusables no proporciona ninguna ventaja sobre el no lavar. Los objetivos del lavado son los siguientes:

1. Reducir la contaminación microbiana de la leche.
2. Disminuir la contaminación entre cuartos y entre vacas.
3. Eliminar toda suciedad visible de la base de la ubre y pezones.
4. No ocasionar irritación de la piel.
5. Ser de bajo costo.
6. Ser de fácil aplicación durante la rutina de ordeño. (Magariños, 2000:31)

La metodología de ordeño higiénico debe desarrollarse en el siguiente orden:

Ordeño mecánico (OIRSA, *et al.* 2007).

1. Preparación de la ubre (preordeño). Lavado y examen visual en busca de anormalidades en cada pezón.
 - 1.1 Examen de superficie. Eliminar impurezas del pezón de forma manual y examinarlo en busca de lesiones, tumefacciones u otras anormalidades.
 - 1.2 Despunte. Descarte de los 3 ó 4 primeros chorros de leche, a fin de: eliminar el sellado del ordeño anterior, eliminar la leche contenida en la cisterna, establecer el estado físico

del pezón y ubre y, finalmente, la manipulación ofrece un estímulo al pezón para facilitar el ordeño.

1.3 Presello. Inmersión del pezón en una solución desinfectante, que se realiza con una parte de Solución yodada al 2% en dos partes de agua, por lo menos por 30 segundos.

1.4 Secado. Secar y limpiar el pezón después del presellado con una toalla de papel desechable.

2 Colocación de la estación de ordeño mecánico.

2.1 Asegurarse de que el pezón este limpio, seco y desinfectado; aproximadamente un minuto después de realizar la desinfección del pezón, se coloca la unidad de ordeño o pezonera.

2.2 Colocar la pezonera, asegurándose de evitar la entrada de aire al sistema.

3 Ordeño.

3.1 El ordeño tendrá una duración promedio de 5-7 minutos por vaca; el operario puede auxiliarse en el reconocimiento de este tiempo mediante la observación del flujo de leche desde la pezonera, una vez el flujo disminuya su caudal considerablemente se debe retirar la pezonera.

3.2 Durante el ordeño se debe evitar deslizamientos o desprendimientos de la pezonera, esto ocurrirá si la colocación de la pezonera fue incorrecta y podrá ocasionar daños en el tejido mamario.

4 Sellado.

4.1 Al retirar la pezonera, el esfínter del pezón queda abierto, lo que hace necesaria la aplicación de una solución desinfectante que evite la contaminación del pezón y la ubre; el sellado se realiza por inmersión, en un recipiente limpio que contenga la solución de presellado, para cubrir toda la superficie del pezón.

4.2 Evitar que los animales se postren en corrales o potreros por espacio de 30-40 minutos, la manera más fácil de lograr esto es ofreciendo comida al momento de finalizar el ordeño.

Ordeño Manual (OIRSA, *et al.* 2007).

1. Lavado e inspección de la ubre.
2. El operario deberá lavar sus manos antes, después y durante (si se requiere) el ordeño.
3. Hacer uso de la indumentaria adecuada.
4. Utilizar recipientes adecuados y bien desinfectados.
5. Sujetar la cola y patas del animal para evitar contaminación.
6. La desinfección se deberá extender hasta abarcar la totalidad de la glándula mamaria y zona inguinal.
7. Realizar el ordeño de forma regular, ininterrumpida y con presión constante de toda la mano sobre el pezón.

2.8 Bacterias aerobias mesófilas (BAM).

Las bacterias aerobias mesófilas, son la flora total contenida en el alimento analizado. La determinación de estos microorganismos puede aportar una idea acerca de la calidad sanitaria y calidad higiénica de la materia prima y de cómo ésta ha sido manipulada a lo largo del proceso productivo. Son un indicador de valor limitado ya que su recuento no indica el género de bacterias presentes, si éstas son patógenas o si hay presencia de toxinas bacterianas en el alimento; sin embargo, recuentos altos de BAM son poco deseables en todos aquellos alimentos que no sean elaborados a través de la fermentación (Pascual y Calderón, 2001).

Un número elevado de flora total por lo general indica que la materia prima está demasiado contaminada o que durante la elaboración de los productos finales no se han aplicado normas higiénicas efectivas; además cuando se encuentran niveles por encima de 10^6 - 10^7 UFC/mL en un alimento, se considera que éste ha entrado en el proceso de descomposición (Pascual y Calderón, 2001).

La leche recolectada de forma aséptica de vacas limpias y sanas obtiene generalmente recuentos de menos de 1000 UFC/mL. Recuentos más altos sugieren que las bacterias contaminantes acceden a la leche por una variedad de posibles vías. Aunque es imposible eliminar todas las fuentes de contaminación, recuentos de 5000 o 1000 UFC/mL son posibles. La mayoría de explotaciones suelen alcanzar un recuento de menos de 10,000 UFC/mL.

Una de las causas más frecuentes de recuentos altos de BAM en agar es la poca higiene del sistema de ordeño y sus componentes, sea éste manual o mecánico; residuos de leche de ordeños previos en los utensilios proveen de un sustrato para el crecimiento y desarrollo de bacterias que contaminan la leche de ordeños posteriores. Entre otras prácticas que pueden contribuir a la alza en el recuento están: el ordeño de vacas con mastitis subclínica o clínica, la falta de higiene en el alojamiento o recinto de ordeño, y la falta de refrigeración de la leche recién extraída (Murphy, 2008).

2.9 Coliformes totales y fecales.

La calidad microbiológica de la leche es de gran importancia en Salud Pública, ya que ésta puede servir como vehículo para microorganismos patógenos, sobre todo cuando ésta se utiliza para fabricar productos de forma artesanal. Algunos de los microorganismos patógenos que comúnmente se encuentran en la leche son de origen entérico, es decir, proceden de la materia fecal del humano y los animales (Trigo Tavera, 1998).

Ciertas especies de bacterias, particularmente *Escherichia coli*, y otros microorganismos similares, denominados coliformes fecales, son habitantes normales del intestino grueso de humanos y animales y en consecuencia siempre están en las materias fecales. La presencia de cualquiera de estas especies en la leche es evidencia de contaminación fecal reciente (Madigan y Martinko, 2003).

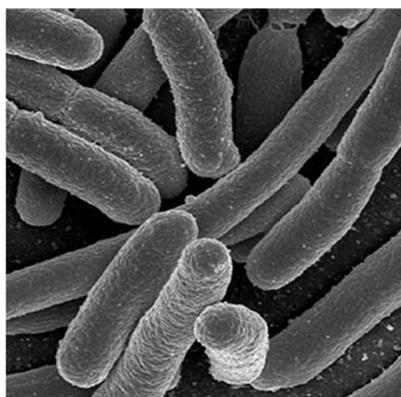


Figura 2: Microscopia electrónica de *Escherichia coli*.

Las bacterias coliformes fecales son normalmente excretadas en las heces de bovinos saludables, por lo tanto, la falta de higiene en el manejo del hato, el uso de agua contaminada, las prácticas de ordeño antihigiénicas, y la inadecuada limpieza y mantenimiento del equipo son causas comunes de recuentos altos de coliformes en leche cruda.

Ya que los recuentos elevados de coliformes fecales en leche cruda sugieren una miríada de prácticas no higiénicas en los establecimientos lecheros su uso como indicador de contaminación fecal es de extrema importancia para la salud pública debido a que la mayoría de agentes patógenos en alimentos provienen de la contaminación con heces fecales, condición que debe ser atendida y corregida de inmediato mediante la implementación de prácticas sanitarias estrictas que minimicen el riesgo de contaminación de la leche cruda (Murphy, 2008).

Los coliformes totales son bacterias Gram negativas de morfología bacilar, aerobias o anaerobias facultativas, oxidasa negativas, que crecen en presencia de sales biliares y fermentan la lactosa a una temperatura de 37° C obteniéndose como productos de fermentación el ácido láctico y gas. Aunque algunos coliformes se encuentran en la naturaleza, la mayoría son de origen entérico, por esta razón son considerados un indicador importante de la calidad de los alimentos y el agua; su presencia indica que existe una alta probabilidad contaminación fecal reciente. Debido a que no todos los coliformes son de origen fecal, es necesario distinguir los coliformes totales de los coliformes fecales (Pascual y Calderón, 2001).

Los coliformes totales poseen las características anteriormente mencionadas y agrupa los siguientes géneros bacterianos: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Los coliformes fecales se diferencian de los coliformes totales porque fermentan la lactosa produciendo ácido y gas a 44.5 °C tras 24 horas de incubación, por esta razón se denominan coliformes termotolerantes. Dentro de este grupo se incluyen cepas de *Klebsiella* y *Escherichia*, siendo la especie *Escherichia coli* el indicador más específico de contaminación fecal (Madigan y Martinko, 2003).

El recuento de coliformes permite seleccionar las bacterias relacionadas comúnmente con contaminación medioambiental (coliformes totales) o materia fecal (coliformes fecales) en una

muestra. La leche se coloca en un medio de cultivo que propicia el crecimiento de coliformes a la vez que inhibe el crecimiento de otras bacterias. La contaminación de la leche con bacterias coliformes puede suceder al ordeñar vacas con ubres sucias o cuando el equipo de ordeño ha tenido contacto con materia fecal, usualmente los recuentos más altos se obtienen por causa de equipos contaminados o con una higiene precaria y es raro que provengan de vacas con mastitis provocada por coliformes (Murphy, 2008).

2.10 *Escherichia coli*.

La mayoría de cepas de *Escherichia coli* no son patógenas, tampoco resisten temperaturas frías (exceptuando las cepas psicrófilas) y se destruyen por medio de la pasteurización, por tanto no representan un riesgo para quienes consumen leche y productos lácteos que han sido pasteurizados. Sin embargo, algunas personas, sobre todo en el área rural consumen leche cruda y productos elaborados a partir de la misma; este grupo de personas puede verse afectado por enfermedades provocadas por las cepas de *Escherichia coli* enterovirulentas. Entre las cepas enterovirulentas destacan aquellas que son capaces de elaborar toxinas (enterotoxigénicas), las citopatogénicas y las enterohemorrágicas; estas cepas virulentas están asociadas a numerosos casos de ETA, entre los cuales se incluyen: leche, queso, carne de ave y ensaladas (Pascual y Calderón, 2001).

Las cepas de *E. coli* enterotoxigénicas ejercen su acción patógena liberando una toxina lábil y/o una toxina estable; la toxina lábil ha sido más estudiada que la toxina estable, pero se cree que ambas actúan de forma análoga. La toxina lábil altera la función celular del epitelio intestinal ocasionando diarrea acuosa profusa con síntomas similares al cólera. Tanto la toxina lábil como la toxina estable son causa de diarrea infantil y de la enfermedad llamada diarrea de los turistas, los síntomas suelen aparecer entre 8 y 48 horas luego de consumir el alimento contaminado; los síntomas incluyen diarrea acuosa con mucosidad y sin sangre, dolores abdominales, vómitos y fiebre (Pascual y Calderón, 2001). Las cepas citopatogénicas invaden las células del epitelio intestinal causando la muerte de las mismas, esto provoca úlceras cuya consecuencia es la diarrea sanguinolenta. Los síntomas suelen ser escalofríos, dolor de cabeza, mialgia, fiebre, dolores abdominales y diarrea profusa con sangre, y se presentan entre las 8 y 24 horas posteriores a la ingestión del alimento. En general las cepas citopatogénicas producen

enfermedades de curso más largo y de mayor gravedad que las cepas enterotoxigénicas (Madigan y Martinko, 2003).

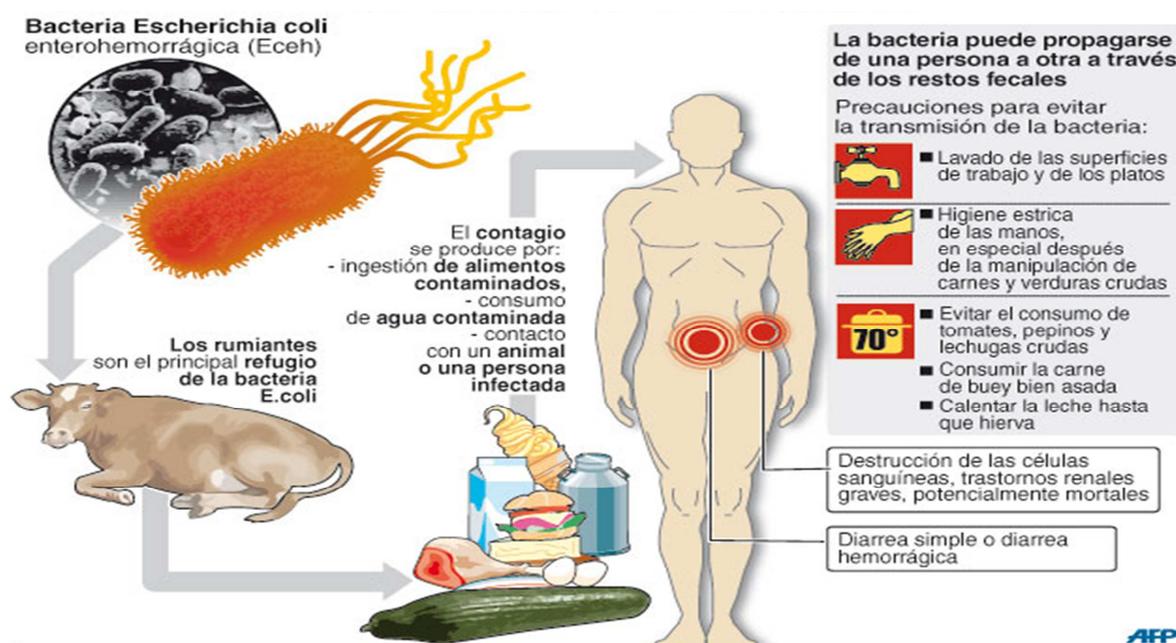


Figura 3: Formas de contagio y prevención de enfermedades causadas por *E. coli*.

Las cepas más importantes de *E. coli* enterovirulentas son las enterohemorrágicas, entre ellas destaca el serovar 0157:H7 productor de la verotoxina, este microorganismo produce varias manifestaciones patógenas: la colitis hemorrágica que causa diarrea acuosa sanguinolenta, el síndrome urémico hemolítico que también produce diarrea sanguinolenta y fallo renal agudo, y la púrpura trombótica trombocitopénica que cursa con diarrea, fallos en el sistema nervioso central y coágulos cerebrales. Esta cepa procede del ganado bovino, por esta razón la carne mal cocida y la leche cruda son los alimentos más involucrados en los brotes de esta enfermedad (Pascual y Calderón, 2001).

2.11 Fuente y causas de conteos bacterianos altos en leche cruda.

La leche es virtualmente estéril al ser secretada por los alvéolos de la ubre, la contaminación puede ocurrir por tres fuentes principales: dentro de la ubre, fuera de la ubre y por las superficies del equipo de almacenamiento y manejo. La salud e higiene de la vaca, la higiene del alojamiento y lugar de ordeño y la limpieza del equipo usado para la extracción y almacenamiento de la leche son los factores clave que influyen en el nivel de contaminación

bacteriana en la leche cruda; igualmente importantes son la temperatura y el tiempo de almacenamiento que pueden condicionar la multiplicación de bacterias en leche (Murphy, 2008)

2.12 Contaminación bacteriana dentro de la ubre.

En vacas sanas la cisterna, el canal y el ápice de la ubre pueden estar colonizados por una gran variedad de bacterias, sin embargo esta carga bacteriana natural no suele aportar significativamente al recuento de BAM ni de coliformes; mientras que las ubres de vacas con mastitis tienen el potencial de contaminar la leche con grandes cantidades de microorganismos. Aún en el caso de que la glándula mamaria se encuentre sana, se reconoce que las primeras porciones de leche ordeñada contienen microorganismos, disminuyendo su número a medida que el ordeño avanza. Esto se explica porque el canal del pezón se encuentra colonizado por muchos microorganismos, como por ejemplo *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, Coliformes, *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc. Esta contaminación se ve acrecentada por el reflujo producido por la ordeñadora de tipo convencional, arrastrando con esto microorganismos que colonizan la punta del pezón, hacia el interior de la ubre.

2.13 Contaminación bacteriana fuera de la ubre.

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

Entre los microorganismos que pueden llegar a la leche por la vía externa, son importantes de señalar aquellos que son patógenos para el hombre, como el *Bacillus cereus* que tiene la capacidad de generar esporas con cierta termorresistencia y que produce cuadros tóxicos en el humano, debido a la producción de enterotoxinas. El *Clostridium perfringens*, formador de esporas, anaerobio y termorresistente, provoca problemas a nivel de la industria quesera y en la salud pública, ocasionando problemas de diarrea y fiebre.

La OMS, ha confeccionado una lista en la que se señalan los agentes patógenos que, transmitidos por la leche, pueden originar enfermedades en el ser humano. Los más importantes son el *Mycobacterium bovis*, microorganismo que puede habitar en la leche; *Brucella abortus*, que se localizan en los ganglios linfáticos mamaros, liberándose a través de la leche por períodos de tiempo muy prolongados; *Coxiella burnetti*, rickettsia que provoca la Fiebre Q y que se libera durante meses en la leche de vacas enfermas; *Pseudomona aeruginosa*, muy resistente a los antibióticos y desinfectantes, presente en la glándula mamaria y que afecta a la salud pública en asociación con ciertos *Staphylococcus*. *Staphylococcus aureus* es el agente causal de numerosos casos de mastitis de carácter subclínico, produce toxinas resistentes al calor; *Streptococcus agalactiae*, típico de mastitis, presentándose por lo general el de tipo B, provoca enfermedades en el humano, principalmente en los recién nacidos, debido a que el aparato urogenital femenino constituye un reservorio; las enterobacterias, como *E. coli* capaz de producir mastitis, pueden originar gastroenteritis debido a la producción de enterotoxinas. (Magariños, 2000)

También existen otros agentes que provocan mastitis, como otras especies de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, bacilos, *Mycoplasmas*, *Corinebacterium*, hongos, levaduras, etc. que, contribuyen a la contaminación de la leche.

2.14 Medio Ambiente.

Si bien el lavado de los pezones es fundamental para obtener una leche de buena calidad microbiológica, no lo es menos el medio ambiente y el equipo de ordeño y de almacenamiento de la leche, ya que frecuentemente suelen ser la fuente más importante en cuanto a contaminación microbiana se refiere. Con respecto al medio ambiente, es importante considerar al ordeñador, el aire y el agua disponible. El ordeñador puede transmitir contaminantes que le sean propios, si es que se encuentra enfermo, actuando de vector al tomar contacto con superficies, utensilios, etc., luego que éstos han sido desinfectados, o por el empleo de malas técnicas de ordeño, como el humedecimiento de las manos con los primeros chorros de leche, no lavar las pezoneras luego de su caída al suelo y previo a su colocación, entre otros. (Murphy, 2008)

Debe reconocerse que el ordeñador presenta el principal componente de todas las operaciones de ordeño y por ello, si se quiere alcanzar el éxito en la producción de leche de calidad, la preocupación debe centrarse en asegurar el cabal conocimiento por parte de éste de todas las operaciones de rutina, de su higiene personal, uso de vestimenta adecuada y el no padecimiento de ninguna enfermedad de tipo infecto-contagiosa.

En cuanto a los microorganismos aportados por el aire a la leche, durante el ordeño, resulta muy pequeña su cantidad, pudiendo tener alguna importancia algunos tipos de bacterias, como *Bacillus cereus*, *Clostridium spp* y *Staphylococcus aureus*. Esto es posible de evitar no dando alimentos durante el ordeño (Magariños, 2000)

2.15 Influencia de la limpieza del equipo y las prácticas de higiene.

Los residuos de leche de ordeños previos sobre las superficies de contacto del equipo, pueden propiciar el crecimiento de una gran variedad de microorganismos mediante la formación de condiciones adecuadas para la proliferación de bacterias especiales, como por ejemplo, las bacterias termófilas pueden resistir limpieza con agua caliente cuando no se eliminan los residuos con detergentes o antisépticos. El mantenimiento de los equipos también cuenta ya que los recipientes con marcas, raspaduras, grietas o tuberías con concreciones lácteas actúan como sitios de persistencia microbiana que a la larga pueden contaminar la leche almacenada en ellos (Murphy, 2008)

Si el equipo tiene un adecuado diseño, correcta instalación y buena higiene, no debe presentar un elemento preocupante en cuanto a contaminación microbiana. La flora microbiana existente en un equipo de ordeño puede resultar variable, y esto se relaciona con el tipo de detergente y desinfectante, la técnica de limpieza, las temperaturas de lavado y el estado de las partes de caucho. Con respecto a estas últimas, debe tenerse presente que se encuentran inevitablemente en una elevada proporción, lo cual es perjudicial desde el punto de vista higiénico, ya que su superficie puede absorber hasta un 30% de su peso en grasa y tienen una vida útil limitada por la acción de las temperaturas elevadas aplicadas en la limpieza y el uso de detergentes fuertemente oxidantes (Magariños, 2000)

El diseño y montaje del equipo de ordeño es uno de los factores que posteriormente incidirá fuertemente sobre la facilidad de limpieza y, en consecuencia, sobre la multiplicación de

microorganismos en la instalación. Por ello, el objetivo primordial en toda instalación y sala de ordeño es la sencillez, evitando en lo posible todo elemento que implique ser desarmado para su limpieza; en el caso en que no sea factible, hay que asegurar que su desarme y montaje resulte fácil. Para el caso de ordeño a mano es recomendable el uso de baldes de boca estrecha y con tapa, con el objeto de disminuir la posibilidad de caída de sustancias extrañas a la leche (Murphy, 2008)

3. Materiales y métodos.

3.1 Localización del estudio.

La investigación se llevó a cabo en dos establecimientos lecheros ubicados en el departamento de Sonsonate, desde junio hasta noviembre del año 2013; el primero de ellos realiza la rutina de ordeño de forma manual y se encuentra ubicado en el Cantón Agua Caliente, municipio de Caluco; el otro establecimiento lechero practica el ordeño mecánico y se encuentra ubicado en el Valle de Zapotitán, municipio de San Julián.

El análisis de las muestras obtenidas en dichos establecimientos y la preparación de los medios de cultivo fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en la Universidad de El Salvador (UES).

3.2 Descripción del estudio.

Antes de poner en marcha la investigación se realizaron visitas en ambos establecimientos lecheros con la finalidad de conocer y documentar las condiciones higiénicas y metodología sanitaria que se aplicaba en el personal de ordeño, la sala de ordeño, maquinaria de ordeño, manejo animal y almacenamiento de la leche (Ver anexo, figura A-1).

Luego de haber visitado los dos establecimientos lecheros se inició con la primera toma de muestras en el establecimiento lechero manual. Las muestras fueron trasladadas al CENSALUD para determinar la carga bacteriana presente en ellas. Posteriormente a la determinación de la calidad microbiológica de manos, ubres y leche cruda producida en el establecimiento lechero manual, se solicitó al personal a cargo de llevar a cabo el ordeño un cambio en su metodología sanitaria; se implementó durante un mes la metodología propuesta

por los investigadores y a partir de ese momento se realizaron visitas periódicas para verificar su cumplimiento (Ver anexo, figura A-2).

Luego de haber implementado el nuevo método de ordeño higiénico, se realizó una segunda toma de muestras, las cuales fueron sometidas nuevamente a un análisis microbiológico para demostrar si el método de ordeño higiénico produjo cambios en la carga bacteriana medida originalmente. Al concluir con la investigación en el establecimiento lechero con ordeño manual, se procedió de la misma manera el establecimiento lechero con ordeño mecánico. Los resultados obtenidos fueron comparados con la Norma Peruana (Ver anexo, cuadro A-1 y A-2) y analizados con el método estadístico no paramétrico de la Prueba del signo.

Las muestras que constituyeron las unidades experimentales en el caso del establecimiento lechero manual fueron las provenientes de: las manos de cinco ordeñadores, cinco ubres de vacas en ordeño y su respectiva muestra de leche, y tres muestras de leche obtenidas del tanque de acopio. En el caso del establecimiento lechero mecánico se muestrearon: cinco pezoneras, cinco ubres de vacas en ordeño y su respectiva muestra de leche y tres muestras de leche obtenidas del tanque de acopio. Para un total general de 72 muestras, el número de muestras fue representativo debido a que las marchas de laboratorio exigieron realizar duplicados y diluciones, donde las muestras adquieren un comportamiento multiplicativo.

3.3. Metodología de campo.

3.3.1 Muestras de leche

Las muestras de leche se tomaron directamente del tanque o recipientes de acopio, una muestra por día durante tres días consecutivos posteriormente al ordeño y homogenización del contenido (Ver anexo, figura A-3). Para obtenerlas se utilizaron jeringas estériles de 50 ml con las que se muestreo en diferentes puntos del tanque de acopio de ambos establecimientos lecheros; así mismo se tomaron muestras de leche de cada vaca, todas las muestras de leche se depositaron en recipientes estériles, y se transportaron al laboratorio para su análisis, refrigerándolas y manteniéndolas entre 2° a 4°C.

3.3.2 Muestras de manos.

Las muestras provenientes de las manos de los operarios se tomaron únicamente en el establecimiento lechero que practica el ordeño manual, para cada muestra se utilizaron 100 mL de agua peptonada al 1% contenidos en un frasco estéril, se vertieron en una bolsa plástica en la cual el operario introdujo sus manos y las enjuagó durante un minuto, el líquido se vertió nuevamente en el frasco para transportar la muestra en una hielera manteniendo una temperatura inferior a 10°C (Ver anexo, figura A-4).

3.3.3 Muestras de pezoneras.

Se tomaron muestras de pezoneras únicamente en el establecimiento lechero mecánico, se obtuvieron mediante hisopado de los bordes y superficies internas de cada pezonera con un hisopo estéril humedecido en agua peptonada al 1%, que luego fue sumergido en un tubo con la solución de agua peptonada en el cual se transportó la muestra a una temperatura inferior a 10°C (Ver anexo, figura A-5).

3.3.4 Muestras de ubre.

El procedimiento se realizó efectuando el hisopado en la totalidad de la ubre bovina, haciendo énfasis en cada uno de los pezones (Ver anexo, figura A-6); el hisopo fue transportado en tubos con solución de agua peptonada al 1%, en una hielera a menos de 10°C (Ver anexo, figura A-7).

Las muestras de ubres y leche obtenidas de cada vaca fueron recolectadas del mismo espécimen en concordancia con lo establecido en la metodología estadística, de manera que en el establecimiento lechero de ordeño manual los números correlativos de muestras de ubre y leche del 1 al 5 corresponden a los siguientes bovinos; 1: Manzana, 08; 2: Chicharra, 13; 3: Pirata, 04; 4: Canelona, 01 y 5: Chilipuca, 19. En tanto que los correlativos para el establecimiento lechero de ordeño mecánico son: 1: 201; 2: 118; 3: 112; 4: 132 y 5: 166.

3.4. Metodología de laboratorio.

3.4.1 Prueba presuntiva para coliformes totales: Para realizar esta prueba, se procesaron las muestras de las manos, pezoneras, ubres y leche, de la siguiente manera: se realizaron tres

diluciones para cada muestra, posteriormente se tomó un mililitro de cada dilución para colocarlo en una placa de Petri a la que se le agregaron 20 ml de agar bilis rojo neutro cristal violeta (VRBA). Cada placa y su respectivo duplicado se incubaron a 35°C durante 24 horas (Ver anexo, figura A-8 y A-9).

Las placas incubadas fueron sometidas a un análisis visual para identificar las colonias sospechosas, con ayuda de un contador de colonias se obtuvo el recuento de UFC por placa considerando colonias sospechosas aquellas que presentaban las siguientes características: color rojo intenso o rojo púrpura con precipitado de sales biliares alrededor y con diámetro mayor a 0.5 mm. El número obtenido se multiplicó por el factor de dilución para obtener el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de muestra (FDA, 2001).

3.4.2 Prueba confirmativa para coliformes totales: La prueba confirmativa de coliformes totales consistió en inocular diez colonias sospechosas de cada una de las muestras de la prueba presuntiva, en tubos de ensayo conteniendo Caldo Bilis Verde Brillante; los tubos fueron incubados durante 24 a 48 horas a 35°C, se consideraron tubos positivos aquellos que presentaron turbidez y acumulación de gas en la campana de Durham. En base a los tubos positivos se corrigió el recuento presuntivo con la siguiente fórmula:

$$\text{Rcto. de coliformes} = \frac{\text{Rcto. Estimado} \times \text{N}^{\circ} \text{ de colonias confirmadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de colonias inoculadas}}$$

3.4.3 Prueba confirmativa para coliformes fecales.

Finalmente la prueba confirmatoria de coliformes fecales se llevó a cabo inoculando tubos que contenían caldo EC con una pequeña muestra de cada tubo positivo de la prueba anterior; se consideraron tubos positivos aquellos que presentaron turbidez y acumulación de gas en la campana de Durham luego de incubarse por 24 horas a 45°C (Ver anexo, figura A-10, A-13 y A-14). En base a los tubos positivos se corrigió el recuento presuntivo con la siguiente fórmula:

$$\text{Rcto de coliformes} = \frac{\text{Rcto. Estimado} \times \text{N}^{\circ} \text{ de colonias confirmadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de colonias inoculadas}}$$

3.4.4 Recuento de bacterias aerobias mesófilas.

Este análisis fue realizado únicamente a las muestras de leche y consistió en realizar tres diluciones para cada muestra, posteriormente se tomó un mililitro de cada dilución para colocarlo en una placa de Petri a la que se le agregaron entre 10 a 15 ml de agar Plate Count. Cada placa y su respectivo duplicado se incubaron a 37°C durante 24 horas y luego se realizó el recuento de colonias en placa. (Ver anexo, figura A-11 y 12).

3.5. Metodología estadística.

La prueba del signo.

Esta prueba se utiliza para un diseño relacionado de dos condiciones cuando los mismos sujetos igualados se desempeñan en ambas condiciones. Esta prueba se maneja para probar pares igualados a fin de determinar si los puntajes de una condición son menores, mayores o iguales que los puntajes de otros. Esta prueba se puede utilizar siempre y cuando los dos puntajes de cada par se puedan jerarquizar (Bonilla, 1995).

Con dicho método se compararon las dos muestras, y se estableció la diferencia de los dos tratamientos, primero antes de instaurar la metodología de ordeño higiénico, y el siguiente después de instaurarlo. La variable consistió en el número de UFC en las muestras recolectadas de manos, pezones, pezoneras y leche; una variable cuantitativa y continua, siendo la requerida por este tipo de estudio. Los valores numéricos se convirtieron a signos antes de continuar el análisis. Lo cual establece si la metodología de ordeño higiénico propuesta proporciona una mejora (+), un empeoramiento (-) o ningún cambio (0). La hipótesis nula se estableció diciendo que no existe ninguna diferencia entre los puntajes de los dos grupos, mientras que la hipótesis alterna o hipótesis de investigación se estableció diciendo que se ha generado un cambio. Para medir la disparidad de signos, se emplearon las siguientes fórmulas:

Cálculo de la media: $\mu = nP$

Cálculo de la desviación típica: $\sigma = nP.Q$

Cálculo de Z: $Z = \frac{X_i - \mu}{\sigma}$

σ

Donde: n es el tamaño de la muestra, P= 0.5, Q= 0.5.

4. Resultados y discusión.

El 100% de las 72 muestras recolectadas en ambos establecimientos, antes y después de la implementación del manual de ordeño higiénico, resultaron positivas a la presencia de coliformes fecales.

De forma general y respondiendo a la hipótesis de investigación, se afirma que aunque la metodología de ordeño higiénico, no garantizó la ausencia de coliformes fecales; si disminuyó significativamente la presencia de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), en todas las muestras recolectadas.

4.1 Establecimiento lechero manual.

Los siguientes cuadros detallan, los promedios de UFC de coliformes totales, de acuerdo a cada dilución y que se obtuvieron en las muestras de: manos, ubres y leche antes y después de aplicar el método de ordeño higiénico.

Cuadro 4: Promedios de recuentos de UFC en la prueba presuntiva de coliformes totales para muestras de manos, ubres y leche antes de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Muestra. | Promedio 1:10 | Promedio 1:100 | Promedio 1:1000 | Promedio total. |
|----------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Manos 1 | Incontables | 14,650 | 29,500 | 22,075 |
| Manos 2 | Incontables | 45,100 | 310,500 | 177,800 |
| Manos 3 | 505 | 2,650 | 0 | 1,052 |
| Manos 4 | 630 | 500 | 0 | 377 |
| Manos 5 | 790 | 50 | 500 | 447 |
| Ubre 1 | 115 | 150 | 0 | 89 (81) |
| Ubre 2 | 160 | 50 | 500 | 237 |
| Ubre 3 | 230 | 300 | 500 | 344 |
| Ubre 4 | 120 | 50 | 0 | 57 (52) |
| Ubre 5 | 215 | 100 | 500 | 272 (245) |
| Leche 1 | 1,265 | 2,550 | 3,000 | 2,405 |
| Leche 2 | 335 | 1,700 | 1,500 | 1768 |
| Leche 3 | 725 | 2,400 | 3,000 | 3,063 |
| Leche 4 | 390 | 1,950 | 1,500 | 3,840 |
| Leche 5 | 695 | 2,850 | 2,000 | 2,773 |

*Se muestran entre paréntesis los recuentos corregidos en base a los tubos positivos de la prueba confirmatoria de coliformes totales.

Cuadro 5: Promedios de recuentos de UFC en la prueba presuntiva de coliformes totales para muestras de manos, ubres y leche después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Muestra. | Promedio 1:10 | Promedio 1:100 | Promedio 1:1000 | Promedio total. |
|----------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Manos 1 | 95 | 400 | 0 | 165 (149) |
| Manos 2 | 135 | 50 | 0 | 62 (50) |
| Manos 3 | 155 | 50 | 0 | 69 (53) |
| Manos 4 | 195 | 50 | 500 | 249 (200) |
| Manos 5 | 85 | 0 | 500 | 195 (137) |
| Ubre 1 | 35 | 50 | 0 | 29 (27) |
| Ubre 2 | 20 | 50 | 0 | 35 (28) |
| Ubre 3 | 50 | 0 | 0 | 17 (16) |
| Ubre 4 | 65 | 0 | 0 | 22 |
| Ubre 5 | 50 | 0 | 0 | 17 (14) |
| Leche 1 | 290 | 850 | 500 | 546 (383) |
| Leche 2 | 450 | 950 | 0 | 467 (281) |
| Leche 3 | 230 | 690 | 500 | 474 (427) |
| Leche 4 | 345 | 810 | 500 | 1,655 (1,332) |
| Leche 5 | 495 | 770 | 1,000 | 755 (529) |

*Se muestran entre parentesis los recuentos corregidos en base a los tubos positivos de la prueba confirmatoria de coliformes totales.

Como se observa en el Cuadro 4, antes de aplicado el método, las muestras que presentaron una mayor cantidad de UFC/mL fueron: las muestras de manos, seguidas por las muestras de leche y finalmente las muestras provenientes de ubres. Al efectuar nuevamente el análisis microbiológico de las mismas muestras, se observó una reducción UFC/mL en todas las muestras; sin embargo, el recuento más alto se obtuvo en las muestras de leche (Ver Cuadro 5).

Cuadro 6: Evaluación de muestras de manos de los operarios mediante la prueba del signo.

| Promedio de UFC/manos antes de aplicar el método de Ordeño Higiénico | | Promedio de UFC/manos después de aplicar el método de Ordeño Higiénico | | Signo de cambio | Valor de Z calculado | Valor crítico de Z tabla |
|--|---------|--|---------|-----------------|----------------------|--------------------------|
| Totales | Fecales | Totales | Fecales | | | |
| 22,075 | 22,075 | 149 | 132 | - | 1.78 | 0.4625 |
| 177,800 | 177,800 | 50 | 50 | - | | |
| 1,052 | 1,052 | 53 | 49 | - | | |
| 377 | 377 | 200 | 200 | - | | |
| 447 | 447 | 137 | 137 | - | | |

Cálculo de la media:

$$\mu = nP = 5 \times 0.50 = 2.5$$

Cálculo de la desviación estándar:

$$\sigma = \sqrt{nP.Q} = \sqrt{5 \times 0.5 \times 0.5} = 1.12$$

Cálculo del valor de Z:

$$Z = \frac{\bar{X}_i - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} = \frac{4.5 - 2.5}{1.12} = 1.78$$

Interpretación del cuadro 6: Como el valor de Z calculado, es mayor al valor crítico de Z de la tabla, rechazamos la hipótesis nula y podemos afirmar que existe una reducción significativa de UFC, en las muestras evaluadas luego de aplicar el método de ordeño higiénico.

Cuadro 7: Evaluación de muestras de ubres de las vacas mediante la prueba del signo.

| Promedio de UFC/ubres antes de aplicar el método de Ordeño Higiénico | | Promedio de UFC/ubres después de aplicar el método de Ordeño Higiénico | | Signo de cambio | Valor de Z calculado | Valor crítico de Z tabla |
|--|---------|--|---------|-----------------|----------------------|--------------------------|
| Totales | Fecales | Totales | Fecales | | | |
| 81 | 81 | 27 | 27 | - | 1.78 | 0.4625 |
| 237 | 237 | 28 | 28 | - | | |
| 344 | 344 | 16 | 14 | - | | |
| 52 | 52 | 22 | 20 | - | | |
| 245 | 245 | 14 | 14 | - | | |

Cálculo de la media:

$$\mu = nP = 5 \times 0.50 = 2.5$$

Cálculo de la desviación estándar:

$$\sigma = \sqrt{nP.Q} = \sqrt{5 \times 0.5 \times 0.5} = 1.12$$

Cálculo del valor de Z:

$$Z = \frac{\bar{X}_i - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} = \frac{4.5 - 2.5}{1.12} = 1.78$$

Interpretación del cuadro 7: Como el valor de Z calculado, es mayor al valor crítico de Z de la tabla, rechazamos la hipótesis nula y podemos afirmar que existe una reducción significativa de UFC, en las muestras evaluadas luego de aplicar el método de ordeño higiénico.

Cuadro 8: Evaluación de muestras de leche cruda de vaca mediante la prueba del signo.

| Promedio de UFC/ml antes de aplicar el método de Ordeño Higiénico | | Promedio de UFC/ml después de aplicar el método de Ordeño Higiénico | | Signo de cambio | Valor de Z calculado | Valor crítico de Z tabla |
|---|---------|---|---------|-----------------|----------------------|--------------------------|
| Totales | Fecales | Totales | Fecales | | | |
| 2,405 | 2,405 | 383 | 383 | - | 1.78 | 0.4625 |
| 1,768 | 1768 | 281 | 327 | - | | |
| 3,063 | 3,063 | 427 | 427 | - | | |
| 3,840 | 3,840 | 1,324 | 1,324 | - | | |
| 2,773 | 2,773 | 529 | 529 | - | | |

Cálculo de la media:

$$\mu = nP = 5 \times 0.50 = 2.5$$

Cálculo de la desviación estándar:

$$\sigma = \sqrt{nP.Q} = \sqrt{5 \times 0.5 \times 0.5} = 1.12$$

Cálculo del valor de Z:

$$Z = \frac{\bar{X}_i - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} = \frac{4.5 - 2.5}{1.12} = 1.78$$

$$\sigma \quad nP.Q \quad 1.12$$

Interpretación del cuadro 8: Como el valor de Z calculado, es mayor al valor crítico de Z de la tabla, rechazamos la hipótesis nula y podemos afirmar que existe una reducción significativa de UFC, en las muestras evaluadas luego de aplicar el método de ordeño higiénico.

Como puede observarse en los cuadros 6, 7 y 8, los recuentos superiores a la norma, fueron producto de ciertas prácticas y condiciones que afectaron negativamente la higiene de las instalaciones y de las herramientas usadas antes, durante y después del ordeño, como por ejemplo: los ordeñadores tenían múltiples tareas dentro de la explotación y su actividad no estaba restringida a la sala de ordeño; el uso de los mismos lazos para la sujeción de animales dentro y fuera de la sala de ordeño, el uso de aditivos lubricantes como manteca de origen animal durante el ordeño y principalmente la renuencia de los operarios a adoptar un nuevo

método de ordeño para ellos desconocido; según Murphy (2008), el ordeñador representa el principal componente de la rutina de ordeño, por lo tanto debe de estar familiarizado con las prácticas higiénicas dentro y fuera de la sala de ordeño, para garantizar que no se convierta en un vector de microorganismos.

En el 100% de las muestras, se comprobó la presencia tanto de coliformes totales como fecales, mediante la prueba confirmativa en tubos. La normativa consultada, establece que ciertas bacterias como las coliformes fecales, no deben estar presentes en ninguna superficie viva o inerte en contacto con los alimentos (DIGESA 2007). Estos datos junto al recuento de UFC en manos y superficie de la prueba presuntiva, nos indican que el método de ordeño higiénico propuesto es efectivo en la reducción de los recuentos bacterianos de coliformes totales; mas no produce una ausencia de coliformes totales y fecales en un 100%.

En las muestras de leche, también se efectuó un recuento de microorganismos aerobios mesófilos, para determinar si el método de ordeño propuesto, generaba reducción en la carga bacteriana que se encuentra normalmente en la leche cruda. Los resultados de ésta prueba se detallan en los cuadros 9 y 10:

Cuadro 9: Promedio de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) detectadas en recuento de bacterias mesófilas en muestras de leche antes y después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Muestra. | Promedio 1:10 | Promedio 1:100 | Promedio 1:1000 | Promedio Total. |
|----------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Día 1 | Incontables | 21,450 | 28,500 | 24,875 |
| Día 2 | Incontables | 26,650 | 77,500 | 52,075 |
| Día 3 | Incontables | 29,550 | 55,500 | 42,525 |

Cuadro 10: Promedio de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) detectadas en recuento de bacterias mesófilas en muestras de leche después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Muestra. | Promedio 1:10 | Promedio 1:100 | Promedio 1:1000 | Promedio total. |
|----------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Día 1 | Incontables | 20,750 | 51,500 | 36,125 |
| Día 2 | Incontables | 24,800 | 70,000 | 47,400 |
| Día 3 | Incontables | 26,250 | 63,500 | 44,875 |

Se observó que la variación en el recuento de UFC/mL antes y después de aplicar el método de ordeño higiénico fue mínima, lo cual se corroboró con la prueba estadística detallada en el Cuadro 11.

Cuadro 11: Evaluación de bacterias aerobias mesófilas en leche cruda de vaca por medio de la prueba del signo.

| Promedio de UFC/ml antes de aplicar el método de Ordeño Higiénico | Promedio de UFC/ml después de aplicar el método de Ordeño Higiénico | Signo de cambio | Valor de Z calculado | Valor crítico de Z tabla |
|---|---|-----------------|----------------------|--------------------------|
| 24,975 | 36,125 | + | -1.14 | -0.4573 |
| 52,075 | 47,400 | - | | |
| 42,525 | 44,875 | + | | |

Cálculo de la media:

$$\mu = nP = 3 \times 0.50 = 1.5$$

Cálculo de la desviación estándar:

$$\sigma = \sqrt{nP.Q} = \sqrt{3 \times 0.5 \times 0.5} = 0.87$$

Cálculo del valor de Z:

$$Z = \frac{\bar{X}_i - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} = \frac{1.5 - 1.5}{\frac{0.87}{\sqrt{3}}} = -1.14$$

Interpretación del cuadro 11: Como el valor de Z calculado, es menor al valor crítico de Z de la tabla, aceptamos la hipótesis nula y podemos afirmar que no existe una reducción significativa de UFC, en las muestras evaluadas luego de aplicar el método de ordeño higiénico.

Al evaluar el Manual de Ordeño Higiénico, se demostró que la metodología implementada, no produce cambios significativos en los recuentos de bacterias mesófilas. Los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con lo que plantean ciertos autores: ya que se considera que la leche es estéril al ser secretada por los alvéolos de la glándula y es invadida por bacterias mesófilas, al pasar por la cisterna y el canal de la ubre (Murphy, 2008), tales microorganismos no representan un riesgo para la salud, pero recuentos elevados, son

asociados a leche de mala calidad o a fallas en su refrigeración. Así mismo pueden observarse en leche que ha iniciado el proceso de descomposición (Pascual y Calderón, 2001).

Aunque no hubo cambios significativos, cabe destacar que los recuentos de bacterias aerobias mesófilas, obtenidos en las muestras de leche provenientes del establecimiento lechero manual, son inferiores a 300,000UFC/MI; por tanto según la Norma Salvadoreña Obligatoria (CONACYT, 2006), la leche producida en este establecimiento es de clase A. Se atribuye que la variación fue mínima, debido a que no existe un método de desinfección interna del pezón y la ubre.

4.2 Establecimiento lechero mecánico.

Al igual que en el establecimiento lechero manual, se presentan los promedios que se obtuvieron en cada dilución de cada muestra (Cuadro 12 y 13), aclarando que en este establecimiento, se muestrearon las pezoneras por ser los objetos que se encuentran en contacto más directo con la leche. Se observó que antes de aplicar el método de ordeño higiénico los valores más altos en el recuento de UFC, se obtuvieron en las muestras de ubre, seguidas por las de leche y siendo las muestras con menor cantidad de UFC, las de las pezoneras.

Cuadro 12: Promedios de recuentos de UFC en la prueba presuntiva de coliformes totales para muestras de pezoneras, ubres y leche antes de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Muestra. | Promedio 1:10 | Promedio 1:100 | Promedio 1:1000 | Promedio total. |
|-------------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Pezonera 1 | 75 | 150 | 1,000 | 409 |
| Pezonera 2 | 50 | 50 | 500 | 300 |
| Pezonera 3 | 60 | 100 | 0 | 54 |
| Pezonera 4 | 100 | 200 | 1,500 | 600 |
| Pezonera 5 | 65 | 150 | 1,000 | 405 |
| Ubre 1 | 705 | 6,200 | 19,000 | 8,635 |
| Ubre 2 | 845 | 6,600 | 21,000 | 9,482 |
| Ubre 3 | 680 | 6,150 | 1,600 | 7,610 |
| Ubre 4 | 685 | 4,900 | 13,500 | 6,362 |
| Ubre 5 | 685 | 6,050 | 13,500 | 6,745 |
| Leche 1 | 120 | 700 | 1,000 | 607 |
| Leche 2 | 220 | 350 | 1,500 | 690 |
| Leche 3 | 120 | 150 | 1,500 | 590 (531) |

| | | | | |
|----------------|-----|-----|-----|-----|
| Leche 4 | 135 | 200 | 0 | 112 |
| Leche 5 | 185 | 350 | 500 | 345 |

*Se muestran entre paréntesis los recuentos corregidos en base a los tubos positivos de la prueba confirmatoria de coliformes totales.

Cuadro 13: Promedios de recuentos de UFC en la prueba presuntiva de coliformes totales para muestras de pezoneras, ubres y leche después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Muestra. | Promedio 1:10 | Promedio 1:100 | Promedio 1:1000 | Promedio total. |
|-------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Pezonera 1 | 40 | 50 | 500 | 197 (177) |
| Pezonera 2 | 45 | 100 | 0 | 49 |
| Pezonera 3 | 25 | 0 | 0 | 9 (8) |
| Pezonera 4 | 45 | 100 | 500 | 215 (194) |
| Pezonera 5 | 79 | 200 | 0 | 90 (81) |
| Ubre 1 | 95 | 250 | 500 | 282 (254) |
| Ubre 2 | 105 | 100 | 1,000 | 402 (362) |
| Ubre 3 | 65 | 150 | 0 | 72 (51) |
| Ubre 4 | 100 | 50 | 0 | 50 (40) |
| Ubre 5 | 80 | 0 | 0 | 27 (25) |
| Leche 1 | 120 | 100 | 500 | 240 |
| Leche 2 | 95 | 100 | 0 | 65 (52) |
| Leche 3 | 150 | 450 | 500 | 367 |
| Leche 4 | 100 | 50 | 0 | 50 (40) |
| Leche 5 | 125 | 200 | 500 | 275 (248) |

*Se muestran entre paréntesis los recuentos corregidos en base a los tubos positivos de la prueba confirmatoria de coliformes totales.

De igual forma se efectuó un análisis estadístico y se observaron los siguientes resultados:

Cuadro 14: Evaluación de muestras de pezoneras mediante la prueba del signo.

| Promedio de UFC antes de aplicar el método de Ordeño Higiénico | | Promedio de UFC después de aplicar el método de Ordeño Higiénico | | Signo de cambio | Valor de Z calculado | Valor crítico de Z tabla |
|---|----------------|---|----------------|------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Totales | Fecales | Totales | Fecales | | | |
| 409 | 409 | 178 | 178 | - | 1.78 | 0.4625 |
| 300 | 270 | 49 | 49 | - | | |
| 54 | 54 | 8 | 9 | - | | |
| 600 | 540 | 194 | 194 | - | | |
| 405 | 324 | 81 | 81 | - | | |

Cálculo de la media:

$$\mu = nP = 5 \times 0.50 = 2.5$$

Cálculo de la desviación estándar:

$$\sigma = \sqrt{nP.Q} = \sqrt{5 \times 0.5 \times 0.5} = 1.12$$

Cálculo del valor de Z:

$$Z = \frac{X_i - \mu}{\sigma} = \frac{X_i - nP}{nP.Q} = \frac{4.5 - 2.5}{1.12} = 1.78$$

Interpretación del cuadro 14: Como el valor de Z calculado, es mayor al valor crítico de Z de la tabla, rechazamos la hipótesis nula y podemos afirmar que existe una reducción significativa de UFC, en las muestras evaluadas luego de aplicar el método de ordeño higiénico.

Cuadro 15: Evaluación de muestras de ubres de las vacas mediante la prueba del signo.

| Promedio de UFC antes de aplicar el método de Ordeño Higiénico | | Promedio de UFC después de aplicar el método de Ordeño Higiénico | | Signo de cambio | Valor de Z calculado | Valor crítico de Z tabla |
|--|---------|--|---------|-----------------|----------------------|--------------------------|
| Totales | Fecales | Totales | Fecales | | | |
| 8,635 | 8,635 | 254 | 254 | - | 1.78 | 0.4625 |
| 9,482 | 9,482 | 362 | 362 | - | | |
| 7,610 | 7,610 | 51 | 51 | - | | |
| 6,362 | 6,362 | 40 | 40 | - | | |
| 6,745 | 6,745 | 25 | 25 | - | | |

Cálculo de la media:

$$\mu = nP = 5 \times 0.50 = 2.5$$

Cálculo de la desviación estándar:

$$\sigma = \sqrt{nP.Q} = \sqrt{5 \times 0.5 \times 0.5} = 1.12$$

Cálculo del valor de Z:

$$Z = \frac{X_i - \mu}{\sigma} = \frac{X_i - nP}{nP.Q} = \frac{4.5 - 2.5}{1.12} = 1.78$$

Interpretación del cuadro 15: Como el valor de Z calculado, es mayor al valor crítico de Z de la tabla, rechazamos la hipótesis nula y podemos afirmar que existe una reducción significativa de UFC, en las muestras evaluadas luego de aplicar el método de ordeño higiénico.

Cuadro 16: Evaluación de muestras de leche cruda de vaca mediante la prueba del signo.

| Promedio de UFC antes de aplicar el método de Ordeño Higiénico | | Promedio de UFC después de aplicar el método de Ordeño Higiénico | | Signo de cambio | Valor de Z calculado | Valor crítico de Z tabla |
|--|---------|--|---------|-----------------|----------------------|--------------------------|
| Totales | Fecales | Totales | Fecales | | | |
| 607 | 607 | 240 | 240 | - | 1.78 | 0.4625 |
| 690 | 621 | 52 | 52 | - | | |
| 531 | 531 | 367 | 367 | - | | |
| 112 | 101 | 40 | 40 | - | | |
| 345 | 345 | 248 | 248 | - | | |

Cálculo de la media:

$$\mu = nP = 5 \times 0.50 = 2.5$$

Cálculo de la desviación estándar:

$$\sigma = \sqrt{nP.Q} = \sqrt{5 \times 0.5 \times 0.5} = 1.12$$

Cálculo del valor de Z:

$$Z = \frac{X_i - \mu}{\sigma} = \frac{X_i - nP}{\sqrt{nP.Q}} = \frac{4.5 - 2.5}{1.12} = 1.78$$

$$\sigma = \sqrt{nP.Q} = 1.12$$

Interpretación del cuadro 16: Como el valor de Z calculado, es mayor al valor crítico de Z de la tabla, rechazamos la hipótesis nula y podemos afirmar que existe una reducción significativa de UFC, en las muestras evaluadas luego de aplicar el método de ordeño higiénico.

Luego de analizar la metodología de ordeño propuesta por los investigadores, se evidenció una reducción significativa en el recuento de UFC, en las superficies muestreadas; pero solo en el 20% de las muestras de pezoneras (Ver cuadro 14), se obtuvieron recuentos inferiores a los permitidos por la normativa consultada. Al igual que en establecimiento lechero manual, el principal factor involucrado en la persistencia de la contaminación, fue el operador de la

estación de ordeño, quien atendía diferentes tareas aparte de la calibración, colocación y retiro de las pezoneras. Según Murphy (2008), los residuos de leche de ordeños previos, en la superficie de contacto del equipo de ordeño y defectos físicos como grietas o acumulación de concreciones, pueden propiciar el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, que contaminan la leche con la que están en contacto; si un equipo tiene un adecuado diseño y se higieniza correctamente, no debe ser un elemento preocupante en cuanto a la contaminación bacteriana. Sin embargo, la desinfección depende de los operarios y por ende pueden existir fallas en el proceso. También se observó que los sellos al vacío de las pezoneras son de caucho, material que tiene una vida útil limitada y requiere de reemplazos periódicos cosa que no se realiza por aminorar costos de producción. Lo anterior es confirmado por Magariños, que ha descrito que el caucho es capaz de absorber hasta un 30% de su peso en grasa, lo cual lo convierte en un factor importante de contaminación de la leche durante el ordeño (Magariños, 2000).

Tanto en la prueba de coliformes totales, como en la prueba de coliformes fecales, se observó que hubo menos tubos positivos, luego de aplicar la metodología de ordeño higiénico. Se comprobó que la mayoría de las colonias sospechosas, resultaron ser positivas; por lo tanto siempre existió contaminación fecal en el 100% de las muestras, luego de haberse implementado el manual. Al igual que en el caso del establecimiento lechero manual, los recuentos de bacterias aerobias mesófilas, antes y después del método fueron muy similares (Ver Cuadro 17 y 18); y esto permite afirmar con más solidez, que el método de ordeño higiénico, no influye significativamente en la reducción de la flora normal, que se encuentra en la leche cruda; pues la variación en los resultados no es significativa. Sin embargo, los recuentos de bacterias aerobias mesófilas, permiten catalogar a la leche producida como clase A (CONACYT 2006), pues todos son inferiores a 300,000 UFC/ml.

Cuadro 17: Promedio de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) detectadas en recuento de bacterias mesófilas en muestras de leche antes de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Muestra. | Promedio 1:10 | Promedio 1:100 | Promedio 1:1000 | Promedio total. |
|-----------------|----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Día 1 | Incontables | 23,150 | 25,500 | 24,325 |
| Día 2 | Incontables | 24,250 | 28,000 | 26,125 |
| Día 3 | Incontables | 27,050 | 26,000 | 26,525 |

Cuadro 18: Promedio de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) detectadas en recuento de bacterias mesófilas en muestras de leche después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Muestra. | Promedio 1:10 | Promedio 1:100 | Promedio 1:1000 | Promedio total. |
|----------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Día 1 | Incontables | 23,750 | 19,000 | 21,375 |
| Día 2 | Incontables | 30,000 | 28,000 | 29,000 |
| Día 3 | Incontables | 25,300 | 28,000 | 26,650 |

Cuadro 19: Evaluación de bacterias aerobias mesófilas en leche cruda de vaca por medio de la prueba del signo.

| Promedio de UFC antes de aplicar el método de Ordeño Higiénico | Promedio de UFC después de aplicar el método de Ordeño Higiénico | Signo de cambio | Valor de Z calculado | Valor crítico de Z tabla |
|--|--|-----------------|----------------------|--------------------------|
| 24,325 | 21,375 | - | -1.14 | -0.4573 |
| 26,125 | 29,000 | + | | |
| 26,525 | 26,650 | + | | |

Cálculo de la media:

$$\mu = nP = 3 \times 0.50 = 1.5$$

Cálculo de la desviación estándar:

$$\sigma = \sqrt{nP.Q} = \sqrt{3 \times 0.5 \times 0.5} = 0.87$$

Cálculo del valor de Z:

$$Z = \frac{X_i - \mu}{\sigma} = \frac{X_i - nP}{\sigma} = \frac{0.5 - 1.5}{0.87} = -1.14$$

$$\sigma = \sqrt{nP.Q} = 0.87$$

Interpretación del cuadro 19: Como el valor de Z calculado es menor al valor crítico de Z de la tabla, aceptamos la hipótesis nula y podemos afirmar que no existe una reducción significativa de UFC en las muestras evaluadas luego de aplicar el método de ordeño higiénico.

5. CONCLUSIONES.

- 1) En el 100% de las muestras recolectadas durante la investigación, se observó una reducción en el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC); sin embargo todas resultaron positivas a la presencia de coliformes totales y fecales, es decir que la implementación del manual de ordeño higiénico, si redujo la carga bacteriana presente en la leche cruda, pero no garantizó la ausencia de coliformes totales y fecales en la leche cruda de vaca.
- 2) Los recuentos de bacterias aerobias mesófilas, obtenidos en las muestras de leche cruda de vaca, después de haber implementado el manual, indican que la metodología de ordeño higiénico propuesta, no genera cambios significativos en la cantidad de bacterias presentes en la leche cruda.
- 3) Las prácticas higiénicas y sanitarias, influyen directamente en la calidad microbiológica de la leche cruda de vaca.
- 4) Con la aplicación de la metodología de ordeño higiénico propuesta en los establecimientos lecheros, se redujo la carga bacteriana de coliformes en las superficies en contacto con la leche, es decir, ubres y manos de los operarios.
- 5) Con la aplicación del método de ordeño higiénico en los establecimientos lecheros, se redujeron los niveles de contaminación bacteriana en la leche ahí producida.
- 6) El uso de una metodología de ordeño higiénico, permite obtener materia prima láctea inocua, para el consumo directo y su procesamiento; reduciendo así el riesgo de padecer enfermedades transmitidas por alimentos y zoonosis en las poblaciones en riesgo.

6. RECOMENDACIONES.

- 1) Implementar una metodología higiénica, para su aplicación en concordancia con las normas internacionales de Buenas Prácticas de Producción Lechera, que abarque no sólo la fase de ordeño sino también el alojamiento de bovinos, el transporte de la leche y el procesamiento de la misma; para garantizar que en todas sus fases la producción láctea sea inocua.
- 2) Realizar muestreos secuenciales de distintos momentos de la producción láctea, como son: transporte, almacenamiento y procesamiento, de forma que se obtengan datos relevantes con respecto al manejo sanitario de la leche como materia prima.
- 3) Se recomienda que los ordeñadores u operarios de las estaciones de ordeño, ingresen a la sala de ordeño únicamente cuando utilicen la indumentaria adecuada, y sus instrumentos de trabajo se encuentren limpios.
- 4) Proponer que la metodología de ordeño higiénico aquí descrita, se adopte como un método comprobado y estandarizado para su aplicación, en los establecimientos lecheros y se refuerce su importancia por las instancias reguladoras de salud animal y humana de nuestro país.
- 5) Recomendar a los productores de la zona, la implementación de una metodología de ordeño higiénico; no sólo para la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos, sino también como un método eficiente de obtener un producto inocuo, y la consecuente ventaja de optar a premios por desempeño e higiene por parte de las compañías procesadoras.

7. BIBLIOGRAFÍA

Amaya Solís I.C.; Escobar Barrera M.C.; Huezo Saravia R.C.; Rodríguez Hernández A.E.B. 2006. Factores Relevantes para el Manejo del Hato Lechero. Tesis Lic. San Salvador, SV. Universidad Centroamericana “José Simeón Cañas”. 273 p.

Arévalo Castillo, LR, Ministerio de Agricultura y Ganadería; 2003. Situación Actual de la ganadería Bovina de Pequeños Productores en El Salvador. San Salvador, SV. 24 p.

Asamblea Legislativa de la República de El Salvador. 2001. Código de Salud. Tomo Único. San Salvador, SV. 87 p.

Bonilla G. 1995. Como Hacer una Tesis de Graduación con Técnicas Estadísticas. San Salvador, SV. BCA Ed. 228 p

CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). 2006. Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.01:06 Leche Cruda de Vaca. Primera Actualización. San Salvador, ESA. 6 p.

CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). 1998. Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.02: 96 leche Pasteurizada. San Salvador, ESA. 5 p.

DIGESA (Dirección General de Salud Ambiental). 2007. Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas. 1ª ed. Lima, PE, S.e. 15 p.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2008. Boas práticas de ordenha. 1 edición. Sao Paulo, BR. 49 p.

FDA (Food and Drug Administration) 2001. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 4. Enumeration of Escherichia coli and the coliform bacteria (on line). AOAC International, Gaithersburg, Md.

Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., Gutiérrez, G. FAO. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico; estudios de caso en Guatemala, El Salvador, Honduras, Costa Rica y Nicaragua. Roma, IT. 194p.

Madigan, MT., Martinko, JM. 2003. Biología de los Microorganismos. Prentice-Hall 10ª edición. Madrid. ES. Np.

MAG, (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2011. Anuario de Estadísticas Agropecuarias 2010-2011. San Salvador, SV. 65 p.

Magariños, H. 2000. Producción Higiénica de la Leche Cruda. –una guía para la pequeña y mediana empresa. Valdivia, CL. 93 p.

MINECO (Ministerio de Economía), CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), MIFIC (Ministerio de Fomento, Industria y Comercio), SIC (Secretaría de Industria y Comercio), MEIC (Ministerio de Economía, Industria y Comercio) .2008. Reglamento Técnico Centroamericano. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. SV. 34p.

Murphy, S.C. 2008. Raw Milk Bacteria Tests. Standard Plate Count, Preliminary Incubation Count, Lab Pasteurization Count and Coliform Bacteria Count & Sources and Causes of High Bacteria Counts-An Abreviated Review- (en línea). Dairy Foods Science Notes. 607(5): 1-7. Consultado 18 noviembre 2013. Disponible en: <http://www.learningace.com/doc/2478025/d5f0c0902c82093926692fcd80ec0a9e/cu-dfscience-notes-bacteria-raw-milk-review-09-08>

OIRSA. (Organismo Internacional Regional de Sanidad Animal). 2007. Manual Buenas Prácticas en explotaciones lecheras para Centroamérica, Panamá y Belice. San Salvador. SV. 42p.

OMS (Organización Mundial de la Salud, CH); FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2011 Codex Alimentarius: Leche y productos lácteos. 2 ed. Roma, IT. 259 p.

Pascual Anderson, MR., Calderón, V. 2001. Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para alimentos y bebidas. 2 Ed. Ed. Díaz de Santos. ES. 464 p.

Rosa da Costa, MS. 2009. Boas Práticas de Manejo – Ordenha. Sao Paulo, BR. FUNEP. 43 p.

SAGARPA (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, ME); SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, MX). 2009. Manual de Buenas Practicas Pecuarias en Unidades de Producción de Leche Bovina. 1 ed. México D.F., MX. s.e. 108 p.

SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agropecuaria, AR). 1999. Manual para la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control (HACCP) en la Industria Láctea. Buenos Aires, AR. S. e. 89 p.

Trigo Tavera, FJ. 1998. Patología Sistémica Veterinaria. 3 ed. México D.F, MX. McGraw-Hill. 417 p.

8. Anexos.

Cuadro A-1: Límites permisibles para coliformes totales y patógenos para muestras recolectadas por medio de enjuague.

| SUPERFICIES | | | | |
|----------------------------|--------------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Método del enjuague | Vivas | | Pequeñas o internas | |
| Ensayo | Limite de detección del método | Limite permisible | Limite de detección del método | Limite permisible |
| Coliformes totales | 100 UFC/manos | 100 UFC/manos | 25 UFC/superficie muestreada | 25 UFC/superficie muestreada |
| Patógeno | Ausencia/manos | Ausencia /manos | Ausencia / superficie muestreada | Ausencia / superficie muestreada |

(Tomado de DIGESA. 2007.)

Cuadro A-2: Límites permisibles para coliformes totales y patógenos para muestras recolectadas por medio de hisopado.

| SUPERFICIES INERTES | | | | |
|----------------------------|---|---|----------------------------------|----------------------------------|
| Método del Hisopo | Superficie regular | | Superficie irregular | |
| Ensayo | Limite de detección del método | Limite permisible | Limite de detección del método | Limite permisible |
| Coliformes totales | 0.1 UFC/cm ² | 1 UFC/cm ² | 10 UFC/superficie muestreada | 10 UFC/superficie muestreada |
| Patógeno | Ausencia/superficie muestreada en cm ² | Ausencia / superficie muestreada en cm ² | Ausencia / superficie muestreada | Ausencia / superficie muestreada |

(Tomado de DIGESA. 2007.)

Cuadro A-3: Cantidad de UFC detectadas en la prueba presuntiva de coliformes en muestra de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero manual, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Dilución Muestra | Dilución 1:10 | Dilución 1:10 | Dilución 1:100 | Dilución 1:100 | Dilución 1:1000 | Dilución 1:1000 |
|-------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Manos 1 | Incontables. | Incontables. | 13,400 | 15,900 | 35,000 | 24,000 |
| Manos 2 | Incontables. | Incontables. | 47,500 | 42,700 | 261,000 | 360,000 |
| Manos 3 | 670 | 340 | 4,300 | 1,000 | 0 | 0 |
| Manos 4 | 520 | 740 | 800 | 200 | 0 | 0 |
| Manos 5 | 820 | 760 | 100 | 0 | 1,000 | 0 |
| Ubre 1 | 120 | 110 | 200 | 100 | 0 | 0 |
| Ubre 2 | 190 | 130 | 100 | 0 | 1000 | 0 |
| Ubre 3 | 250 | 210 | 400 | 200 | 1000 | 0 |
| Ubre 4 | 150 | 90 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| Ubre 5 | 230 | 200 | 100 | 100 | 1000 | 0 |
| Leche 1 | 740 | 1,790 | 2,600 | 2,500 | 3,000 | 3,000 |
| Leche 2 | 460 | 210 | 2,300 | 1,100 | 2,000 | 1,000 |
| Leche 3 | 890 | 560 | 2,800 | 2,000 | 3,000 | 3,000 |
| Leche 4 | 400 | 380 | 2,100 | 1,800 | 2,000 | 1,000 |
| Leche 5 | 870 | 520 | 3,000 | 2,700 | 3,000 | 1,000 |

Cuadro A-4: Cantidad de UFC detectadas en la prueba presuntiva de coliformes en muestra de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero manual, después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Dilución Muestra | Dilución 1:10 | Dilución 1:10 | Dilución 1:100 | Dilución 1:100 | Dilución 1:1000 | Dilución 1:1000 |
|-------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Manos 1 | 110 | 80 | 500 | 300 | 0 | 0 |
| Manos 2 | 140 | 130 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| Manos 3 | 210 | 100 | 100 | 0 | 1,000 | 0 |
| Manos 4 | 230 | 160 | 100 | 0 | 1,000 | 0 |
| Manos 5 | 70 | 100 | 0 | 0 | 1,000 | 0 |
| Ubre 1 | 50 | 20 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| Ubre 2 | 30 | 10 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| Ubre 3 | 60 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ubre 4 | 80 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ubre 5 | 40 | 60 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Leche 1 | 310 | 270 | 900 | 800 | 1,000 | 0 |
| Leche 2 | 480 | 420 | 1,000 | 900 | 0 | 0 |
| Leche 3 | 260 | 200 | 710 | 670 | 1,000 | 0 |
| Leche 4 | 390 | 300 | 840 | 780 | 1,000 | 0 |
| Leche 5 | 510 | 480 | 810 | 730 | 1,000 | 1,000 |

Cuadro A-5: Cantidad de tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes totales en muestras de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero manual, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Tubo Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Manos1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Manos2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Manos3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Manos4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Manos5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 1 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| Ubre 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 4 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 5 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| Leche1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Cuadro A-6: Cantidad de tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes totales en muestras de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero manual, después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Tubo Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Manos1 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| Manos2 | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Manos3 | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + |
| Manos4 | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Manos5 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - |
| Ubre 1 | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 2 | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + |
| Ubre 3 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 5 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Leche1 | + | - | + | + | - | + | + | + | + | - |
| Leche 2 | - | + | + | - | + | - | + | - | + | + |
| Leche 3 | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 4 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - |
| Leche 5 | + | - | - | + | + | + | - | + | + | + |

Cuadro A-7: Cantidad de tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes fecales en muestras de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero manual, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Tubo Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Manos1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Manos2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Manos3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Manos4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Manos5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 1 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| Ubre 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 4 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 5 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| Leche1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Cuadro A-8: Cantidad de tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes fecales en muestras de manos, ubres y leche, en el establecimiento lechero manual, después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Tubo Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Manos1 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| Manos2 | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Manos3 | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + |
| Manos4 | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Manos5 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - |
| Ubre 1 | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 2 | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + |
| Ubre 3 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - |
| Ubre 4 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| Ubre 5 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Leche1 | - | + | + | - | + | - | + | - | + | + |
| Leche 2 | - | + | + | - | + | - | + | - | + | + |
| Leche 3 | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 4 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - |
| Leche 5 | + | - | - | + | + | + | - | + | + | + |

Cuadro A-9: Cantidad de tubos positivos en las pruebas confirmatorias de coliformes totales y fecales para muestras de manos, ubres y leche; antes y después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Muestra | Coliformes totales | | Coliformes fecales | |
|---------|--------------------|---------|--------------------|---------|
| | Antes | Después | Antes | Después |
| Manos 1 | 10 | 9 | 10 | 8 |
| Manos 2 | 10 | 8 | 10 | 8 |
| Manos 3 | 10 | 8 | 10 | 7 |
| Manos 4 | 10 | 8 | 10 | 8 |
| Manos 5 | 10 | 7 | 10 | 7 |
| Ubre 1 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| Ubre 2 | 10 | 8 | 10 | 8 |
| Ubre 3 | 10 | 9 | 10 | 8 |
| Ubre 4 | 9 | 10 | 9 | 9 |
| Ubre 5 | 9 | 8 | 9 | 8 |
| Leche 1 | 10 | 7 | 10 | 7 |
| Leche 2 | 10 | 6 | 10 | 7 |
| Leche 3 | 10 | 9 | 10 | 9 |
| Leche 4 | 10 | 8 | 10 | 8 |
| Leche 5 | 10 | 7 | 10 | 7 |

Cuadro A-10: Cantidad de UFC detectadas en recuento de bacterias mesófilas en muestras de leche, en el establecimiento lechero manual, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Dilución Muestra | Dilución 1:10 | Dilución 1:10 | Dilución 1:100 | Dilución 1:100 | Dilución 1:1000 | Dilución 1:1000 |
|------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Día 1 | Incontables. | Incontables. | 21,800 | 21,100 | 11,000 | 46,000 |
| Día 2 | Incontables. | Incontables. | 27,600 | 25,700 | 78,000 | 77,000 |
| Día 3 | Incontables. | Incontables. | 28,200 | 30,900 | 61,000 | 50,000 |

Cuadro A-11: Cantidad de UFC detectadas en recuento de bacterias mesófilas en muestras de leche, en el establecimiento lechero manual, después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Dilución Muestra | Dilución 1:10 | Dilución 1:10 | Dilución 1:100 | Dilución 1:100 | Dilución 1:1000 | Dilución 1:1000 |
|------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Día 1 | Incontables. | Incontables. | 21,000 | 20,500 | 55,000 | 48,000 |
| Día 2 | Incontables. | Incontables. | 26,100 | 23,500 | 73,000 | 67,000 |
| Día 3 | Incontables. | Incontables. | 28,300 | 24,200 | 66,000 | 61,000 |

Cuadro A-12: Cantidad de UFC detectadas en la prueba presuntiva de coliformes en muestra de pezoneras, ubres y leche, en el establecimiento lechero mecánico, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Dilución Muestra | Dilución 1:10 | Dilución 1:10 | Dilución 1:100 | Dilución 1:100 | Dilución 1:1000 | Dilución 1:1000 |
|-------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Pezonera1 | 80 | 70 | 200 | 100 | 1,000 | 1,000 |
| Pezonera2 | 50 | 50 | 100 | 0 | 1,000 | 0 |
| Pezonera3 | 70 | 50 | 200 | 0 | 0 | 0 |
| Pezonera4 | 110 | 90 | 300 | 100 | 2,000 | 1,000 |
| Pezonera5 | 70 | 60 | 200 | 100 | 1,000 | 1,000 |
| Ubre 1 | 780 | 630 | 6,500 | 5,900 | 21,000 | 17,000 |
| Ubre 2 | 850 | 840 | 7,200 | 6,000 | 24,000 | 18,000 |
| Ubre 3 | 700 | 660 | 6,900 | 5,400 | 19,000 | 13,000 |
| Ubre 4 | 690 | 680 | 5,100 | 4,700 | 16,000 | 11,000 |
| Ubre 5 | 770 | 600 | 6,300 | 5,800 | 15,000 | 12,000 |
| Leche 1 | 130 | 110 | 800 | 600 | 1,000 | 1,000 |
| Leche 2 | 240 | 200 | 400 | 300 | 2,000 | 1,000 |
| Leche 3 | 140 | 100 | 200 | 100 | 2,000 | 1,000 |
| Leche 4 | 150 | 120 | 300 | 100 | 0 | 0 |
| Leche 5 | 200 | 170 | 500 | 200 | 1,000 | 0 |

Cuadro A-13: Cantidad de UFC detectadas en la prueba presuntiva de coliformes en muestra de pezoneras, ubres y leche, en el establecimiento lechero mecánico, después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Dilución Muestra | Dilución 1:10 | Dilución 1:10 | Dilución 1:100 | Dilución 1:100 | Dilución 1:1000 | Dilución 1:1000 |
|-------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Pezonera1 | 40 | 40 | 100 | 0 | 1,000 | 0 |
| Pezonera2 | 50 | 40 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| Pezonera3 | 30 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pezonera4 | 60 | 30 | 100 | 100 | 1,000 | 0 |
| Pezonera5 | 80 | 60 | 200 | 200 | 0 | 0 |
| Ubre 1 | 100 | 90 | 300 | 200 | 1,000 | 0 |
| Ubre 2 | 130 | 80 | 100 | 100 | 2,000 | 0 |
| Ubre 3 | 80 | 50 | 200 | 100 | 0 | 0 |
| Ubre 4 | 120 | 80 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| Ubre 5 | 90 | 70 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Leche 1 | 130 | 110 | 200 | 0 | 1,000 | 0 |
| Leche 2 | 100 | 90 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| Leche 3 | 180 | 120 | 700 | 200 | 1,000 | 0 |
| Leche 4 | 120 | 80 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| Leche 5 | 130 | 120 | 200 | 200 | 1,000 | 0 |

Cuadro A-14: Cantidad de tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes totales en muestras de pezoneras, ubres y leche, en el establecimiento lechero mecánico, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Tubo Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| Pezonera1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Pezonera2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pezonera3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pezonera4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pezonera5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 3 | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Leche 4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Cuadro A-15: Cantidad de tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes totales en muestras de pezoneras, ubres y leche, en el establecimiento lechero mecánico, después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Tubo Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| Pezonera1 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| Pezonera2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pezonera3 | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - |
| pezonera4 | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pezonera5 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Ubre 1 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 2 | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Ubre 3 | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - |
| Ubre 4 | + | - | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Ubre 5 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| Leche 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 2 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Leche 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 4 | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Leche 5 | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |

Cuadro A-16: Cantidad de tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes fecales en muestras de pezoneras, ubres y leche, en el establecimiento lechero mecánico, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Tubo Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| Pezonera1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Pezonera2 | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pezonera3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pezonera4 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| pezonera5 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - |
| Ubre 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| Leche 3 | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Leche 4 | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Cuadro A-17: Cantidad de tubos positivos detectados en la prueba confirmatoria de coliformes fecales en muestras de pezoneras, ubres y leche, en el establecimiento lechero mecánico, después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Tubo Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| Pezonera1 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| Pezonera2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pezonera3 | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - |
| pezonera4 | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pezonera5 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Ubre 1 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ubre 2 | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Ubre 3 | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - |
| Ubre 4 | + | - | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Ubre 5 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| Leche 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 2 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Leche 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Leche 4 | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Leche 5 | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |

Cuadro A-18: Cantidad de tubos positivos en las pruebas confirmatorias de coliformes totales y fecales para muestras de pezoneras, ubres y leche; antes y después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Muestra | Coliformes totales | | Coliformes fecales | |
|--------------------|--------------------|---------|--------------------|---------|
| | Antes | Después | Antes | Después |
| Pezionera 1 | 10 | 9 | 10 | 9 |
| Pezionera 2 | 10 | 10 | 9 | 10 |
| Pezionera 3 | 10 | 8 | 10 | 9 |
| Pezionera 4 | 10 | 9 | 9 | 9 |
| Pezionera 5 | 10 | 9 | 8 | 9 |
| Ubre 1 | 10 | 9 | 10 | 9 |
| Ubre 2 | 10 | 9 | 10 | 9 |
| Ubre 3 | 10 | 7 | 10 | 7 |
| Ubre 4 | 10 | 8 | 10 | 8 |
| Ubre 5 | 10 | 9 | 10 | 9 |
| Leche 1 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Leche 2 | 10 | 8 | 9 | 8 |
| Leche 3 | 9 | 10 | 9 | 10 |
| Leche 4 | 10 | 8 | 9 | 8 |
| Leche 5 | 10 | 9 | 10 | 9 |

Cuadro A-19: Cantidad de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) detectadas en recuento de bacterias mesófilas en muestras de leche, en el establecimiento lechero mecánico, antes de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Dilución Muestra | Dilución 1:10 | Dilución 1:10 | Dilución 1:100 | Dilución 1:100 | Dilución 1:1000 | Dilución 1:1000 |
|------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Día 1 | Incontables. | Incontables. | 23,500 | 22,800 | 28,000 | 23,000 |
| Día 2 | Incontables. | Incontables. | 25,000 | 24,300 | 30,000 | 26,000 |
| Día 3 | Incontables. | Incontables. | 27,200 | 26,900 | 27,000 | 25,000 |

Cuadro A-20: Cantidad de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) detectadas en recuento de bacterias mesófilas en muestras de leche, en el establecimiento lechero mecánico, después de la aplicación del método de ordeño higiénico.

| Dilución Muestra | Dilución 1:10 | Dilución 1:10 | Dilución 1:100 | Dilución 1:100 | Dilución 1:1000 | Dilución 1:1000 |
|------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Día 1 | Incontables. | Incontables. | 24,900 | 22,600 | 20,000 | 18,000 |
| Día 2 | Incontables. | Incontables. | 30,200 | 29,800 | 31,000 | 25,000 |
| Día 3 | Incontables. | Incontables. | 26,500 | 24,100 | 28,000 | 28,000 |

Cuadro A-21: Valores criticos de Z.

| z | .00 | .01 | .02 | .03 | .04 | .05 | .06 | .07 | .08 | .09 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0.0 | .0000 | .0040 | .0080 | .0120 | .0160 | .0199 | .0239 | .0279 | .0319 | .0359 |
| 0.1 | .0398 | .0438 | .0478 | .0517 | .0557 | .0596 | .0636 | .0675 | .0714 | .0753 |
| 0.2 | .0793 | .0832 | .0871 | .0910 | .0948 | .0987 | .1026 | .1064 | .1103 | .1141 |
| 0.3 | .1179 | .1217 | .1255 | .1293 | .1331 | .1368 | .1406 | .1443 | .1480 | .1517 |
| 0.4 | .1554 | .1591 | .1628 | .1664 | .1700 | .1736 | .1772 | .1808 | .1844 | .1879 |
| 0.5 | .1915 | .1950 | .1985 | .2019 | .2054 | .2088 | .2123 | .2157 | .2190 | .2224 |
| 0.6 | .2257 | .2291 | .2324 | .2357 | .2389 | .2422 | .2454 | .2486 | .2517 | .2549 |
| 0.7 | .2580 | .2611 | .2642 | .2673 | .2704 | .2734 | .2764 | .2794 | .2823 | .2852 |
| 0.8 | .2881 | .2910 | .2939 | .2967 | .2995 | .3023 | .3051 | .3078 | .3106 | .3133 |
| 0.9 | .3159 | .3186 | .3212 | .3238 | .3264 | .3289 | .3315 | .3340 | .3365 | .3389 |
| 1.0 | .3413 | .3438 | .3461 | .3485 | .3508 | .3531 | .3554 | .3577 | .3599 | .3621 |
| 1.1 | .3643 | .3665 | .3686 | .3708 | .3729 | .3749 | .3770 | .3790 | .3810 | .3830 |
| 1.2 | .3849 | .3869 | .3888 | .3907 | .3925 | .3944 | .3962 | .3980 | .3997 | .4015 |
| 1.3 | .4032 | .4049 | .4066 | .4082 | .4099 | .4115 | .4131 | .4147 | .4162 | .4177 |
| 1.4 | .4192 | .4207 | .4222 | .4236 | .4251 | .4265 | .4279 | .4292 | .4306 | .4319 |
| 1.5 | .4332 | .4345 | .4357 | .4370 | .4382 | .4394 | .4406 | .4418 | .4429 | .4441 |
| 1.6 | .4452 | .4463 | .4474 | .4484 | .4495 | .4505 | .4515 | .4525 | .4535 | .4545 |
| 1.7 | .4554 | .4564 | .4573 | .4582 | .4591 | .4599 | .4608 | .4616 | .4625 | .4633 |
| 1.8 | .4641 | .4649 | .4656 | .4664 | .4671 | .4678 | .4686 | .4693 | .4699 | .4706 |
| 1.9 | .4713 | .4719 | .4726 | .4732 | .4738 | .4744 | .4750 | .4756 | .4761 | .4767 |
| 2.0 | .4772 | .4778 | .4783 | .4788 | .4793 | .4798 | .4803 | .4808 | .4812 | .4817 |
| 2.1 | .4821 | .4826 | .4830 | .4834 | .4838 | .4842 | .4846 | .4850 | .4854 | .4857 |
| 2.2 | .4861 | .4864 | .4868 | .4871 | .4875 | .4878 | .4881 | .4884 | .4887 | .4890 |
| 2.3 | .4893 | .4896 | .4898 | .4901 | .4904 | .4906 | .4909 | .4911 | .4913 | .4916 |
| 2.4 | .4918 | .4920 | .4922 | .4925 | .4927 | .4929 | .4931 | .4932 | .4934 | .4936 |
| 2.5 | .4938 | .4940 | .4941 | .4943 | .4945 | .4946 | .4948 | .4949 | .4951 | .4952 |
| 2.6 | .4953 | .4955 | .4956 | .4957 | .4959 | .4960 | .4961 | .4962 | .4963 | .4964 |
| 2.7 | .4965 | .4966 | .4967 | .4968 | .4969 | .4970 | .4971 | .4972 | .4973 | .4974 |
| 2.8 | .4974 | .4975 | .4976 | .4977 | .4977 | .4978 | .4979 | .4979 | .4980 | .4981 |
| 2.9 | .4981 | .4982 | .4982 | .4983 | .4984 | .4984 | .4985 | .4985 | .4986 | .4986 |
| 3.0 | .4987 | .4987 | .4987 | .4988 | .4988 | .4989 | .4989 | .4989 | .4990 | .4990 |

LISTA DE FIGURAS.**Figura A-1: Evaluacion de rutina de ordeño****Figura A-2: Supervision metodo ordeño higienico.****Figura A-3: Tanque de acopio ganadería con ordeño mecánico**

Figura A-4: Muestreo de manos.



Figura A-5: Muestreo de pezoneras.



Figura A-6: Muestreo de ubres



Figura A-7: Muestras transportadas en refrigeración.



Figura A-8: Diagrama prueba presuntiva.

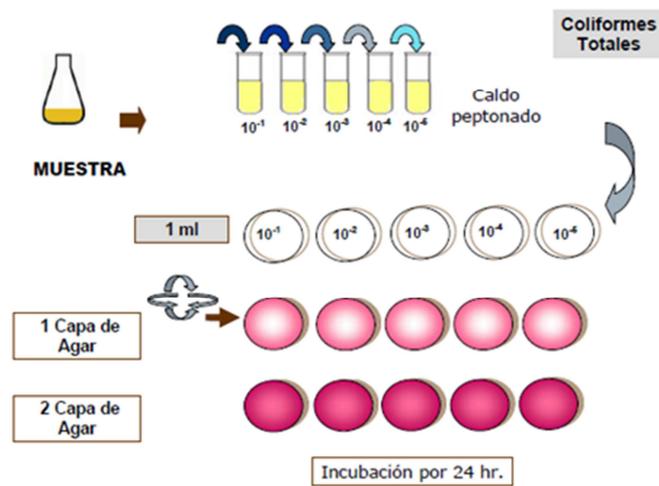


Figura A-9: Muestras durante la incubación.



Figura A-10: Inoculación de tubos.



Figura A-11: Recuento de colonias.



Figura A-12: Recuento de colonias.

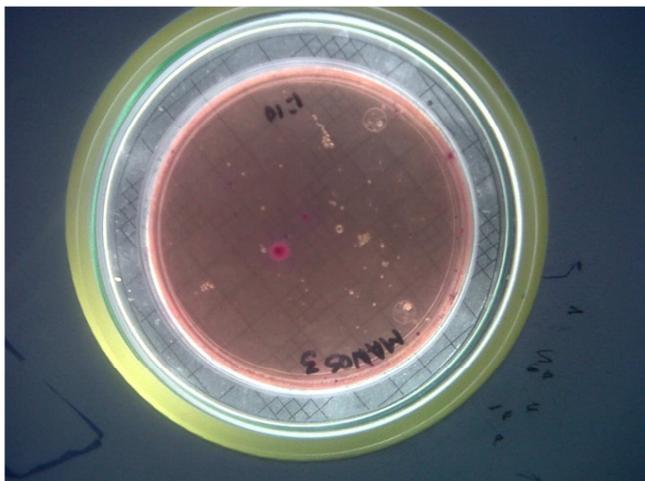


Figura A-13: Lectura de tubos positivos.



Figura A-14: Lectura de tubos positivos.



Anexo A-1: Toma de muestras por el método del hisopado.

a) Descripción: Consiste en frotar un hisopo estéril previamente humedecido en una solución diluyente, el área determinada en el muestreo.

b) Materiales:

- Hisopos de algodón u otro material equivalente, de largo aproximado de 12cm.
- Tubos de ensayo con tapa hermética conteniendo 10 ml de solución diluyente estéril.
- Plantilla estéril con un área abierta en el centro de 100 ó 25 cm cuadrados.
- Guantes descartables de primer uso.
- Protector de cabello.
- Mascarillas descartables.
- Plumón marcador indeleble.
- Caja térmica.
- Refrigerante.

c) Procedimiento:

1. Humedecer el hisopo en la solución diluyente y presionar ligeramente en la pared del tubo con un movimiento de rotación para quitar el exceso de solución.
2. Con el hisopo inclinado en un ángulo de 30°, frotar 4 veces la superficie, cada una en dirección opuesta a la anterior. Asegurar el hisopado en toda la superficie.
3. Colocar el hisopo en el tubo con la solución diluyente, quebrando la parte del hisopo que estuvo en contacto con los dedos del muestreador, la cual debe ser eliminada.
4. Para superficies irregulares, en el caso de utensilios, se repetirá la operación con 3 utensilios más, con el mismo hisopo considerando el área en contacto con los alimentos o la boca

Anexo A-2: Toma de muestras por el método de enjuague.

a) Descripción: Dependiendo de la muestra, el método consiste en realizar un enjuague (botellas, frascos, utensilios) o inmersión (manos, objetos pequeños) en una solución diluyente.

b) Materiales:

- Frascos con tapa hermética de boca ancha de 250 ml de capacidad con 100 ml de solución diluyente estéril.
- Bolsas de polietileno de primer uso.
- Pinzas estériles.
- Guantes descartables de primer uso.
- Protector de cabello.
- Mascarillas descartables.
- Plumón marcador indeleble.
- Caja térmica.
- Refrigerantes.

c) Procedimiento (manos):

1. Vaciar el diluyente del frasco (100ml) en una bolsa plástica de primer uso.
2. Introducir las manos a muestrear hasta la altura de la muñeca.
3. Solicitar al manipulador que realice un frotado de los dedos y particularmente alrededor de las uñas y la palma de la mano, adicionalmente el muestreador deberá realizar la misma operación a través de las paredes de la bolsa, durante 1 minuto aproximadamente.
4. Luego de retirar las manos se regresa el liquido al frasco o se anuda la bolsa y esta se coloca en otra bolsa para que este segura; en este caso, la bolsa que se utilice deberá ser estéril.

Anexo A-3: Preparación de solución de agua peptonada al 1%.

1. Disolver un gramo del medio de cultivo en cada litro de agua.
2. Calentar levemente para asegurar la completa disolución del medio.
3. Distribuir en recipientes estériles.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Anexo A-4: Preparación de caldo bilis verde brillante.

1. Disolver 40 gramos del medio de cultivo en cada litro de agua.
2. Calentar levemente para asegurar la completa disolución del medio.
3. Distribuir en tubos de ensayo con tapón de rosca estériles.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Anexo A-5: Preparación de caldo EC.

1. Disolver 40.5 gramos del medio de cultivo en cada litro de agua.
2. Calentar levemente para asegurar la completa disolución del medio.
3. Distribuir en tubos de ensayo con tapón de rosca estériles.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Anexo A-6: Preparación de agar bilis rojo neutro cristal violeta.

1. Disolver 41.5 gramos del medio de cultivo en cada litro de agua.
2. Calentar hasta conseguir la ebullición para asegurar la completa disolución del medio.
3. Distribuir en Placas de Petri estériles.
4. No autoclavar.

Anexo A-7: Preparación de agar Plate Count.

1. Disolver 24 gramos del medio de cultivo en cada litro de agua.
2. Calentar hasta conseguir la ebullición para asegurar la completa disolución del medio.
3. Distribuir en Placas de Petri estériles.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Anexo A-8: Recuento de bacterias aerobias mesófilas.

1. Realizar una dilución madre con 90ml de solución de agua peptonada al 0.1% y añadir 10 ml de la muestra de leche. Esta dilución constituye también la primer dilución de la serie 10^{-1} (1:10).
2. Con una pipeta estéril tomar 1 ml de la dilución 10^{-1} (1:10) y verterlo en un tubo que contenga 9ml de agua peptonada al 0.1% para obtener la dilución 10^{-2} (1:100), con la misma

pipeta tomar 1ml de la dilución 10^{-1} (1:10) y verterlo en una caja Petri estéril, vacía y debidamente identificada.

3. Con otra pipeta estéril tomar 1 ml de la dilución 10^{-2} (1:100) y verterlo en un tubo que contenga 9ml de agua peptonada al 0.1% para obtener la dilución 10^{-3} (1:1000), con la misma pipeta tomar 1ml de la dilución 10^{-2} (1:100) y verterlo en una caja Petri estéril, vacía y debidamente identificada.

4. Con una pipeta estéril tomar 1 ml de la dilución 10^{-3} (1:1000) y verterlo en una caja Petri estéril, vacía y debidamente identificada.

5. A cada una de las cajas de Petri correspondientes a cada dilución, añadir 15 ml de agar plate count a 35°C, homogenizar adecuadamente y dejar solidificar.

6. Incubar las placas a 32° C durante 24-48 horas, seleccionar las placas que contienen entre 30-300 colonias y ese número se multiplica por el factor de dilución para obtener el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de muestra (OMS, 2011).

Anexo A-9: Prueba presuntiva para la detección de coliformes.

1. Para cada una de las muestras de manos, pezoneras, ubres y leche, realizar una dilución madre con 90ml de solución de agua peptonada al 0.1% y 10 ml de muestra. Esta dilución constituye también la primer dilución de la serie 10^{-1} (1:10).

2. Con una pipeta estéril tomar 1 ml de la dilución 10^{-1} (1:10) y verterlo en un tubo que contenga 9ml de agua peptonada al 0.1% para obtener la dilución 10^{-2} (1:100), con la misma pipeta tomar 1ml de la dilución 10^{-1} (1:10) y verterlo en una caja Petri estéril, vacía y debidamente identificada.

4. Con otra pipeta estéril tomar 1 ml de la dilución 10^{-2} (1:100) y verterlo en un tubo que contenga 9ml de agua peptonada al 0.1% para obtener la dilución 10^{-3} (1:1000), con la misma pipeta tomar 1ml de la dilución 10^{-2} (1:100) y verterlo en una caja Petri estéril, vacía y debidamente identificada.

5. Con una pipeta estéril tomar 1 ml de la dilución 10^{-3} (1:1000) y verterlo en una caja Petri estéril, vacía y debidamente identificada.

6. A cada una de las cajas de Petri correspondientes a cada dilución, añadir 15 ml de agar Bilis rojo neutro cristal violeta a 47° C, homogenizar adecuadamente y dejar solidificar.

7. Cuando el agar este solidificado agregar aproximadamente 5 ml de agar bilis rojo neutro cristal violeta sobre la superficie del agar, formando una nueva capa para prevenir el crecimiento superficial y facilitar el recuento de colonias.

8. Incubar las placas a 35° C en el caso de las muestras de manos, pezoneras y ubres, y a 32°C si se trata de muestras de leche, durante 24 horas, seleccionar las placas que contienen entre 25-250 colonias típicas (color rojo intenso o rojo púrpura con precipitado de sales biliares alrededor y con diámetro mayor a 0.5 mm) y ese número se multiplica por el factor de dilución para obtener el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de muestra (FDA, 2001).

Anexo A-10: Prueba confirmatoria de coliformes totales.

1. Seleccionar al menos 10 colonias típicas e inocular cada una de ellas en un tubo conteniendo 10 ml de caldo bilis verde brillante y tubo de Durham.

2. Incubar durante 24-48 horas a 35°C (±0.5 °C).

3. Luego del período de incubación observar los tubos y si se observa turbidez y producción de gas la prueba se considera positiva. Si no se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez se considera que la prueba es negativa.

4. Cuando todas las colonias sometidas a confirmación dan un resultado positivo, significa que el recuento presuntivo fue confirmado totalmente, si solo algunas colonias resultan positivas, es necesario calcular el recuento de coliformes totales, de la siguiente forma:

$$\text{Rcto de coliformes} = \frac{\text{Rcto. Estimado} \times \text{N}^{\circ} \text{ de colonias confirmadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de colonias inoculadas}}$$

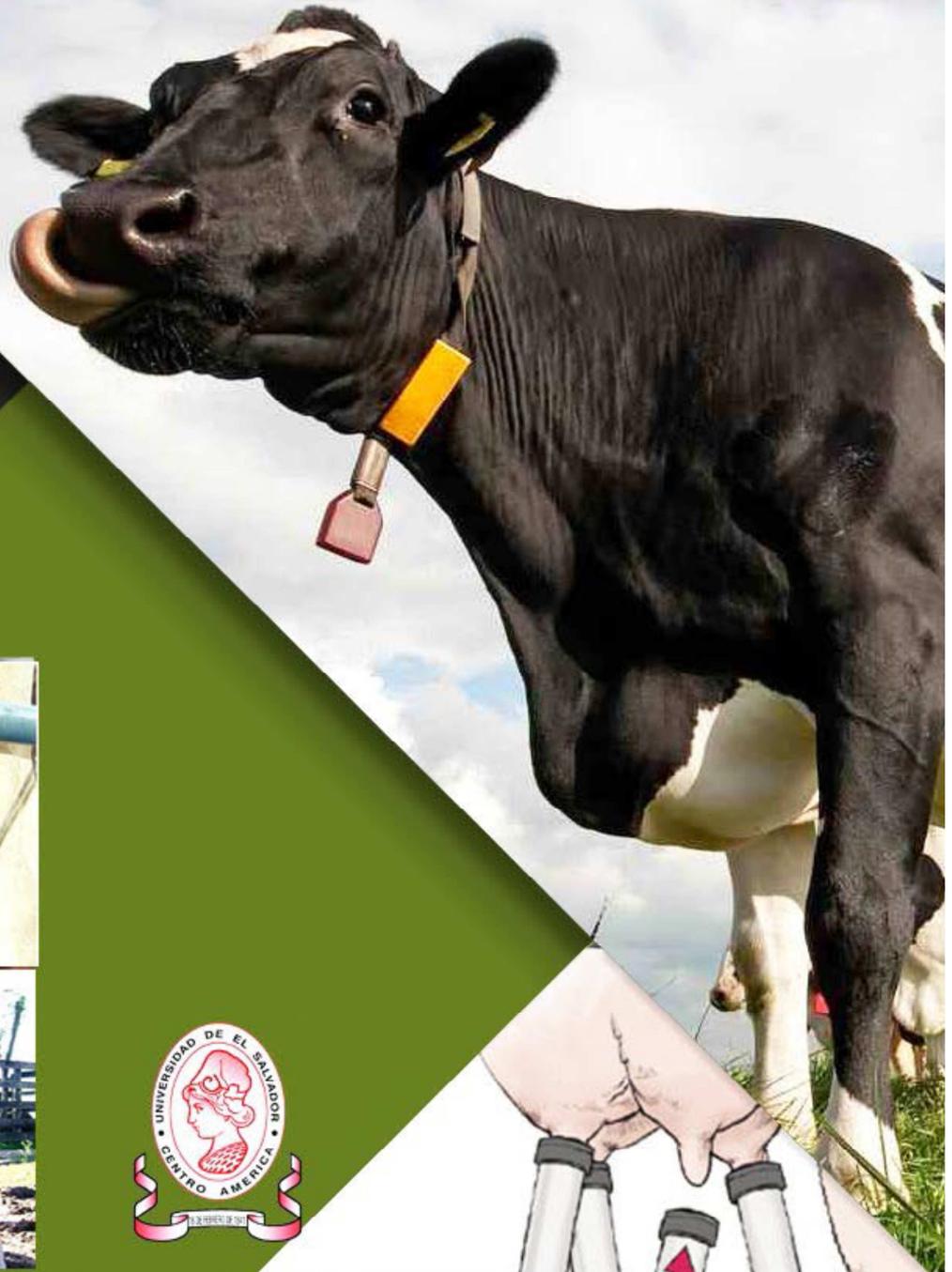
Anexo A-11: Prueba confirmatoria de coliformes fecales.

1. Inocular en un tubo conteniendo 10 ml de caldo EC y tubo de Durham tres asadas de cada tubo positivo de la prueba confirmatoria para coliformes totales, para comprobar la presencia de coliformes fecales.

2. Incubar durante 24-48 horas a 45°C.

3. Luego del periodo de incubación observar los tubos y si se comprueba turbidez y producción de gas la prueba se considera positiva. Si no se comprueba producción de gas, aún cuando se observe turbidez se considera que la prueba es negativa (FDA, 2001).

MANUAL DE ORDEÑO HIGIÉNICO



Universidad de El Salvador

Facultad de Ciencias Agronómicas

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
MANUAL DE ORDEÑO HIGIÉNICO.



Presentado por:

-Br. MANUEL ERNESTO ALFARO RODRÍGUEZ

-Br. ANDREA GUADALUPE HURTARTE RODRÍGUEZ

-Br. RICARDO FRANCISCO VALLE HERNÁNDEZ



Índice.

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Introducción..... | 1 |
| Ambito de aplicación..... | 2 |
| Objetivos..... | 3 |
| Conceptos generales..... | 4 |
| Limpieza del personal..... | 5 |
| Sala de ordeño..... | 6 |
| Materiales..... | 7 |
| Preordeño..... | 8 |
| Ordeño manual..... | 10 |
| Ordeño mecánico..... | 11 |
| Sellado..... | 12 |
| Bibliografía..... | 13 |



Introducción:

En un esfuerzo por que la leche sea producida por animales sanos, bajo condiciones sanitarias óptimas satisfaciendo las expectativas de la industria alimentaria y de los consumidores; hemos convenido realizar el presente manual de ordeño higiénico.

Es imprescindible un control eficaz en la producción primaria de leche, a fin de evitar las consecuencias para la salud humana y la economía que derivan de las enfermedades y los daños provocados por la contaminación y el deterioro de la misma.

Todos los productores y manipuladores de leche tienen la responsabilidad de asegurarse de que la misma sea apta para su procesamiento, que sea producida por animales sanos, bajo condiciones aceptables para éstos últimos y en equilibrio con el medio ambiente, satisfaciendo las expectativas de la industria alimentaria y de los consumidores; apoyándose en la implementación de las Buenas Prácticas de Ordeño Higiénico



Ámbito de aplicación.

Los protocolos explicados en el presente manual pretenden ser aplicados en cualquier tipo de ganadería de nuestro país, siendo concisos y enfáticos en la importancia de ejecutar un ordeño higiénico, así mismo esta adaptado a la realidad de dichos productores.

Conscientes de la importancia que tiene la implementación de técnicas higiénicas en todas las fases de la producción y procesamiento de productos de origen animal y sabedores de la importancia de todas las fases que la producción láctea contiene, hemos decidido restringir este manual a el proceso de ordeño, por su especial importancia en ser la fase donde la leche tiene su primer contacto con el medio ambiente y por tanto está expuesta a posibles contaminantes.



Objetivos

Ofrecer un método asequible y eficiente para garantizar la producción higiénica de la leche en establecimientos lecheros de ordeño manual y mecánico.

Capacitar a los ordeñadores en la ejecución del método de ordeño higiénico en establecimientos lecheros de ordeño manual y mecánico.



Conceptos Generales.

Contaminación: Es la introducción accidental o premeditada de agentes contaminantes durante el proceso de extracción o en la leche misma.

Contaminante: Cualquier agente físico, biológico o químico ajeno a la composición de la leche o a las superficies que estén en contacto con la misma y que comprometen su integridad

Desinfección: Es la reducción de la presencia de microorganismos contaminantes por medios químicos o físicos en superficies o alimentos.

Leche: Es la secreción de la glándula mamaria del bovino sin alteraciones ni adulteraciones, recolectada mediante el ordeño.

Limpieza: Remoción de suciedad, residuos y otras sustancias impropias en las superficies de utensilios y la ubre bovina.

Ordeño: Consiste en la extracción de la secreción láctea a través de la glándula mamaria bovina mediante el empleo de la presión manual en los pezones o la colocación de estaciones de succión al vacío.

Presellado: Sumergir parte del pezón en una solución desinfectante antes del ordeño y después de la limpieza de la ubre.



Limpeza del personal.

- No tener ninguna enfermedad contagiosa.
- Mantener las manos y brazos limpios en todo momento.
- Usar ropa limpia, redecilla para el cabello, tapabocas, guantes de látex (ordeño mecánico) y botas de hule.
- Mantener uñas, cabello y barba corta.
- Bañarse diariamente.
- No comer ni fumar durante el ordeño.
- No escupir, estornudar o toser sobre la ubre, la leche, utensilios y equipos que tienen contacto directo con la leche.
- No tocarse la nariz, boca, oídos, cabello, ni otras áreas desnudas del cuerpo que puedan ser causa de contaminación, en caso de hacerlo lavarse las manos o cambiar guantes de látex (ordeño mecánico).



Sala de ordeño.

De suma importancia es el hecho de que existan ciertas medidas higiénicas en la sala o corral de ordeño como son:

-Evitar la presencia de animales de otras especies cuya presencia podría significar la contaminación del proceso de ordeño o el producto final.

-Mantener pisos y paredes limpios de materia orgánica de cualquier tipo (heces, comida, vegetación, etc.)

-Comederos y bebederos, de haberlos, deben ser vaciados y limpiados al final de cada ordeño.

-Mantener la infraestructura en buen estado y libre de chatarra y otros pertrechos no utilizables durante el ordeño.

-Ordeñar primero a las novillas y recién paridas, luego a las que van a media producción, después a las que van a secado y por último a las que tienen mastitis y están bajo tratamiento de medicamentos.



Materiales:



-Batas plasticas.



-Botas de hule.



-Guantes de Látex.



-Redecilla para el pelo.



-Tapaboca.



-Solución de yodo al 2% en dos partes de agua.



-Jabón antibacterial.



-Papel toalla desechable.



-Taza fondo oscuro.



Preparación de la ubre.

Lavado e inspección: Lavar con agua potable (solamente el pezón) y examinar en busca de anomalías en cada pezón.



Despunte de la ubre: Descarte de los 3 ó 4 primeros chorros de leche, a fin de eliminar el sellado del ordeño anterior.

Eliminar la leche contenida en la cisterna, establecer el estado físico del pezón y ubre y, finalmente el manipuleo ofrece un estímulo al pezón para facilitar el ordeño.

Probar en una taza de fondo oscuro el estado de la leche (si no posee grumos, color, olor) de manera de no ordeñar de cuartos con mastitis.



Presello: Inmersión del pezón en una solución desinfectante, que se realiza con una parte de solución de yodo al 2% en dos partes de agua, por lo menos por 30 segundos.

Sumergir por lo menos 3/4 del pezón en la solución.



Secado: Secar y limpiar el pezón después del presellado con una toalla de papel desechable.



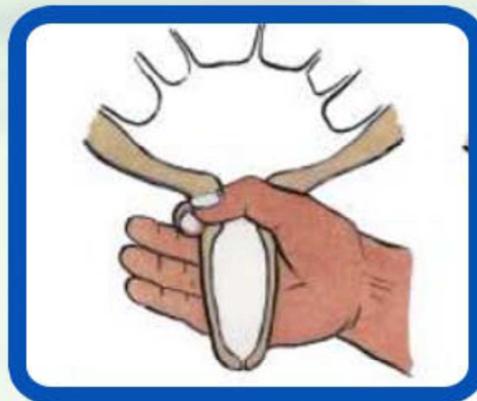
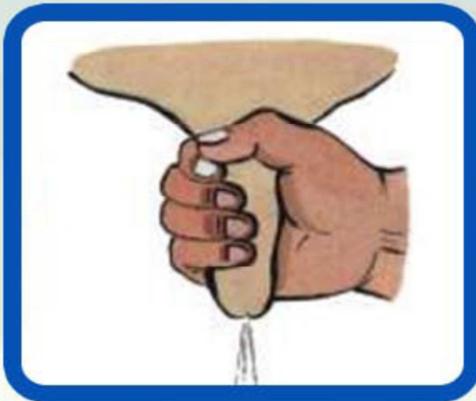
Ordeño manual:

-Primero sujetar bien la cola y patas de la vaca, después lavarse las manos.

-No se debe pellizcar ni halar los pezones para evitar daños en los tejidos de la glándula mamaria.

-El ordeño manual se debe realizar a manos llenas si el pezón es normal, o con dos dedos si el pezón es pequeño.

-De igual manera, no sobreordeñar a la vaca, ya que se puede incurrir en daños en el pezón.



Sellado.

-Al retirar la pezonera o finalizar el ordeño manual, el esfínter del pezón queda abierto, lo que hace necesaria la aplicación de una solución desinfectante que evite la contaminación del pezón y la ubre; el sellado se realiza por inmersión, en un recipiente limpio que contenga la solución de presellado, para cubrir toda la superficie del pezón.

-Evitar que los animales se postren en corrales o potreros por espacio de 30-40 minutos, la manera más fácil de lograr esto es ofreciendo comida al momento de finalizar el ordeño.

-Es recomendable que las camas de los corrales sean de arena y no de tierra.



Bibliografía.

-EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2008. Boas práticas de ordenha. Sao Paulo, BR. 49 p.

-Magariños, H. 2000. Producción Higiénica de la Leche Cruda: una guía para la pequeña y mediana empresa. Valdivia, CL. 93 p.

-(OIRSA). Organismo Internacional Regional de Sanidad Animal. 2007. Manual Buenas Prácticas en explotaciones lecheras para Centroamérica, Panamá y Belice. 42p.

-SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, ME); SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, MX). 2009. Manual de Buenas Practicas Pecuarias en Unidades de Producción de Leche Bovina. México D.F., MX. s.e. 108 p.



