

69



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETECCION DE PATOGENOS EN LECHE BRONCA DE BOVINO EN EL EJIDO BENITO JUAREZ: MUNICIPIO DE ALMOLOYA DE JUAREZ, EDO. DE MEXICO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
MARIA GUADALUPE VARGAS RAZO



MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2002



EXAMENES

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

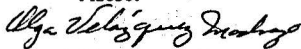
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

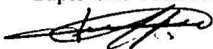
Presidente	Olga Velázquez Madrazo
Vocal	Zoila Nieto Villalobos
Secretario	Maria Elena Cañizo Suárez
1er. Suplente	Aurora Irma Ortegón Ávila
2do. Suplente	Juan Gúzman Calderón

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 4-C y CEPARIO del Edificio A de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria. UNAM.


Asesor


Olga Velázquez Madrazo

Supervisor Técnico


Luciano Hernández Gómez

Sustentante


Maria Guadalupe Vargas Razo

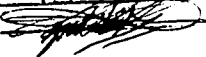
F 
 **uímica**
Facultad de Química

"Si lo puedes soñar, lo puedes lograr"
Walt Disney

Autorizo a la Dirección General de Informática
UNAM a difundir en formato electrónico el
contenido de mi trabajo académico.

NOMBRE: Vargas Ma. Gpe.

FECHA: 13-21-02

FIRMA: 

Con especial cariño:

A *Dios*, por darme la fortaleza necesaria para lograr vencer tantos obstáculos que se me presentaron y porque me envió, la solución a mis problemas, por medio de tantas personas maravillosas y con grandes valores, que me transmitieron vida, en esos días tan difíciles, aun están presentes en mi vida. Muchas gracias por todo, este trabajo es para ti.

A mis *padres*, principalmente es a quienes quiero dedicar este trabajo, porque gracias a su apoyo incondicional, tengo la dicha de llegar a este momento. Por el orgullo de ser su hija.

A mi hermano *Cesar*, por darme fuerza, para emprender este camino el cual no era fácil, pero siempre confié en mi.

Definitivamente a mis hermanas *Ana Ibeth* y *Ana Yelli*, por su apoyo moral y su cariño con el que consolaron tantos problemas, por ser mis mejores amigas, por su compañía a lo largo de mi carrera.

A *Juanita*, por brindarme su apoyo desde que me conoció y porque ahora formas parte de mi familia.

A la mujer que tengo la dicha de conocer y me ha enseñado que vivir es un reto diario y jamás olvidare todo su apoyo y confianza en mi persona.

Mi Mamá

Por tenerla la dicha de conocerla y es un orgullo muy grande para mí, contar con su apoyo, Gracias!!

Q.F.B. Olga Velázquez Madrazo

A mis amigos que estuvieron conmigo, a lo largo de toda la carrera, porque son parte de mi vida y compartimos muchos momentos juntos.

***Luis Edgar**

***Sandra**

***Elena**

***Judith**

***Aurea**

***Rosa I.**

*** Neli**

Solo les puedo decir, que prefiero tenerlos a ustedes, que a un centenar y me embargue la hipocresía.

ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	5
3. Generalidades.....	6
4. Metodología.....	16
5. Resultados.....	29
6. Discusión.....	38
7. Conclusiones.....	40
8. Apéndice.....	43
9. Bibliografía.....	45



INTRODUCCIÓN

La lechería en pequeña escala es una actividad que ocupa a una buena parte de la población rural en el centro y occidente del país, y por lo tanto, constituye el sustento de muchas familias de escasos recursos.

Por esa razón, la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia está realizando un proyecto de investigación y desarrollo rural, (IN301990 PAPIIT) cuya finalidad es identificar el impacto socioeconómico de la actividad lechera en pequeña escala y proponer las posibilidades de desarrollo de la población, con base en esta actividad. Este trabajo forma parte de dicho proyecto.

La leche y sus derivados son alimentos de primera necesidad para los humanos, por el valor nutritivo que poseen, pero esos mismos atributos nutricionales la hacen un medio de cultivo excelente para muchos microorganismos, incluyendo a varios patógenos. También son productos altamente perecederos, porque además de su contenido de nutrientes, la actividad acuosa (a_w) y el pH facilitan el crecimiento de una gran cantidad y variedad de microorganismos.

Finalmente, por la forma en que se produce, la leche también es un vehículo adecuado para la transmisión de patógenos. Muchos microorganismos del ambiente, del pelo ó la piel del animal logran llegar al pezón y penetrar en el conducto lactífero; como éste contiene siempre un poco de leche y la temperatura es la ideal para el desarrollo de microorganismos mesófilos, puede haber multiplicación de bacterias patógenas. En algunas ocasiones puede desarrollarse la mastitis o enfermedad inflamatoria de la glándula mamaria, aunque numerosos microorganismos pueden desarrollar sin provocar daño ó síntoma alguno en la vaca.



Los microorganismos también pueden llegar a la leche a través del equipo, cuando no está adecuadamente lavado y sanitizado.

La refrigeración permite retardar el desarrollo microbiano en la leche, y la pasteurización logra la inactivación ó eliminación de los microorganismos patógenos, asegurando la inocuidad de la leche, pero estas opciones difícilmente están disponibles para pequeños productores rurales.

En nuestro país el consumo de leche está dirigido fundamentalmente a niños, embarazadas y personas adultas con padecimientos crónicos, lo que representa un grupo de riesgo para enfermedades de origen alimentario. De ahí que en la calidad de la leche, además de la composición y los atributos sensoriales, es muy importante el aspecto sanitario aunque, lamentablemente, en algunas situaciones como las de producción en pequeña escala, es el menos atendido.

En cambio, muchos de los derivados de la leche, aunque son ricos en nutrientes, tienen menor actividad acuosa (a_w) ó menor pH y en algunos casos, otras diferencias que los hacen menos adecuados para el desarrollo microbiano y aumentan su vida de anaquel. De ahí deriva otra razón importante, además del desarrollo de los pequeños productores, para buscar alternativas de procesamiento para la leche producida en pequeña escala.

Actualmente, el Estado de México está integrado por 122 municipios, 24 de los cuales se encuentran en el Valle de Toluca, área geográfica que la SAGAR identifica como el Distrito de Desarrollo Rural No. 1.

En dicha zona, en el municipio de Almoloya de Juárez, se encuentra el Ejido Benito Juárez, que es una de las pequeñas comunidades rurales a las cuales está apoyando la



Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, mediante el proyecto mencionado, el cual se realiza utilizando una metodología de investigación y desarrollo participativo con la comunidad.

Mediante el censo realizado al inicio del proyecto, se obtuvo la siguiente información:

- * El hato lechero del Ejido Benito Juárez es de unas 143 cabezas, pertenecientes a 79 pequeños productores de leche, que tienen en promedio 2 vacas cada uno.

- * El manejo higiénico de la ordeña es muy deficiente en todos los establos.

- * Todos los productores venden la leche bronca a los "boteros" o intermediarios que compran toda la producción, fijando el precio a su conveniencia.

- * No hay posibilidades de refrigeración, pasteurización, ni otra forma de conservación o procesamiento para la leche en la comunidad.

- * Además de la venta a los boteros, los productores no tienen otras opciones para comercializar la leche, ya que carecen de acceso a otros mercados y de alternativas de procesamiento.

- * Los boteros también manejan la leche con muchas deficiencias higiénicas.

Por todo ello, se considera prioritario proporcionar a los pequeños productores, alternativas de procesamiento para la leche. El primer paso para ello es caracterizar la leche producida en el Ejido Benito Juárez, por lo que se han realizado 3 trabajos paralelos: Caracterización físico-química, Determinación de la calidad sanitaria y éste: Detección de patógenos en leche bronca de bovino en el Ejido Benito Juárez, municipio de Almoloya de Juárez, Estado de México.

Si la leche no tiene una calidad satisfactoria — química o sanitaria — para ser procesada, el primer paso tendrá que ser el mejoramiento de la calidad de la materia prima. Aún antes de establecer alguna forma de procesamiento para la leche producida en esta comunidad, es de gran importancia la orientación a los productores para promover el mejoramiento de la calidad sanitaria del producto.



Además hay que recordar que ningún proceso mejora una mala materia prima, y que, en el caso de la leche, la falta de calidad en la materia prima puede hacer imposible el proceso de pasteurización, que es fundamental para la inocuidad del producto y de los derivados, e incluso para producir algunos de ellos, como el yogurt.

Este trabajo en particular, pretende detectar en la leche, microorganismos patógenos de importancia en Salud Pública, ya que aunque no hay regulación para todos ellos, pueden afectar la salud de los consumidores, específicamente del grupo de riesgo integrado por niños, embarazadas y personas mayores o con alguna enfermedad crónica.

Una de las metas del proyecto IN301990 PAPIIT es determinar para qué productos con valor agregado, es adecuada la calidad de la leche que se produce en el Ejido. Evidentemente la inocuidad de la leche es un factor muy importante para usarla en la elaboración de cualquier producto.

Por otro lado, los esfuerzos para concientizar a los productores de la importancia que tienen las BPHS en la obtención de leche, son indispensables para la seguridad de los consumidores y para el desarrollo de la comunidad.



OBJETIVO GENERAL

Establecer si la leche bronca producida en el Ejido Benito Juárez, municipio de Almoloya de Juárez, Edo. de México, contiene bacterias patógenas de importancia en Salud Pública.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar si hay presencia de los patógenos regulados en las Normas Mexicanas: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, y *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico, en la leche bronca producida en el Ejido Benito Juárez, municipio de Almoloya de Juárez, Edo. de México.

Determinar si hay presencia de los patógenos no regulados en las Normas Mexicanas para leche: *Mycobacterium spp.* y *Brucella spp.*, en la leche bronca producida en el Ejido Benito Juárez, municipio de Almoloya de Juárez, Edo. de México.



GENERALIDADES

Se define como leche a la secreción natural de la glándula mamaria de los animales mamíferos sanos, es obtenida mediante el ordeño de los animales domésticos; cuando no se indica la especie de la que procede, se entiende por leche, la procedente de la vaca.

La función natural de la leche es la de ser alimento exclusivo de los mamíferos jóvenes durante el periodo crítico de su existencia, tras el nacimiento, cuando el desarrollo es rápido y no pueden consumir otros alimentos.

El ordeño es el procedimiento manual o mecánico que permite extraer la leche contenida en la glándula mamaria, simulando la acción del becerro, mediante la aplicación de una fuerza que comprime el pezón e impulsa la leche hacia el orificio en el extremo distal del mismo.

Las condiciones sanitarias bajo las cuales se lleva a cabo el ordeño influyen decididamente sobre la calidad de la leche, independientemente del sistema productivo y de los insumos tecnológicos utilizados.

La calidad de la leche está determinada no sólo por su composición fisicoquímica y contenido microbiano, si no también por la presencia ó ausencia de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico, entre otros; todo ello determina que la leche sea ó no apta para consumo humano.

La leche producida en la glándula mamaria es estéril. Empieza a adquirir flora microbiana al pasar por los conductos lactíferos durante el ordeño. Éste es el origen más importante del bacilo tuberculoso (BK tipo bovino), así como de *Brucella* y de los estafilococos patógenos. Otros microorganismos patógenos menos frecuentes, así como los causantes de deterioro, también pueden tener este origen.



Otra de las fuentes de contaminación de la leche es el mismo animal, especialmente mediante el excremento que puede llegar a la leche de diversas formas: cuando se acumula en el establo, no se recoge con cuidado, no se asea a la vaca adecuadamente antes del ordeño, ó cuando el operador contamina la zona de la ubre por un manejo inadecuado. También pueden llegar restos de excremento a la leche si los utensilios se dejan en el establo, cerca de las heces y/o si no se lavan y sanitizan antes de usarlos. A través de esta vía de contaminación llegan a la leche diversos microorganismos, entre los que destacan las enterobacterias, como *Escherichia coli*, *Salmonella*, etc.

El agua y el suelo son depósitos de microorganismos que pueden transmitirse a la leche cuando entran en contacto con ella por polvo, gotas de agua ó infiltraciones, en el momento de la obtención, ó a lo largo de su manejo.

El mismo hombre es una causa directa de contaminación que no debe despreciarse; puede realizarla mediante las manos, las expectoraciones, los vestidos sucios, el cabello y de otras muy diversas maneras.

Por todo ello, la leche bronca es un vehículo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's).

Mediante la pasteurización en cualquiera de sus variantes, se pueden eliminar la gran mayoría de los patógenos que pueden encontrarse en la leche y hacerla un alimento seguro. La pasteurización elimina a estos organismos sin afectar las cualidades de la leche, y también aumenta la vida de anaquel porque inactiva enzimas y parte de la flora de deterioro.

En muchos lugares prevalece la idea de que la leche bronca es mejor que la pasteurizada, lo cual pone en riesgo la salud de los consumidores. Además, en casos como el del Ejido Benito Juárez, Almoloya, Edo.Mex., los pequeños productores no cuentan con equipo



para pasteurizar la leche, lo cual tiene como consecuencias una menor vida de anaquel y un mayor peligro de aparición de ETA's.

Los pequeños productores se ven obligados a vender la leche a los intermediarios que mezclan toda la leche que compran en los típicos botes lecheros, y a los que se denomina "boteros", quienes tampoco la pasteurizan, ni la refrigeran. En cambio, la transportan hasta otras poblaciones, en condiciones poco higiénicas, que pueden favorecer el desarrollo microbiano.

A continuación se indican algunas de las infecciones que pueden transmitirse a través de la leche bronca:

Enfermedad	Agente Etiológico	Síntomas y complicaciones
Campilobacteriosis	<i>Campylobacter sp.</i>	diarrea con sangre
Salmonelosis	<i>Salmonella sp.</i>	diarrea con sangre, cefalea
Uremia hemolítica	<i>E. coli</i> O 157:H7	diarrea, daño renal, muerte
Yersiniasis	<i>Yersinia enterocolitica</i>	diarrea
Listeriasis	<i>Listeria monocytogens</i>	meningitis, septicemia
Tuberculosis	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	tuberculosis, neumonía
Brucelosis	<i>Brucella sp.</i>	fiebre, septicemia
Intoxicación estafilocócica	<i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxigénico	vómito, dolor abdominal, fiebre
Fiebre Q	<i>Coxiella burnetti</i>	fiebre, cefalea intensa, mialgia, infección hepática



Enseguida se describen brevemente algunos de estos microorganismos:

Campylobacter jejuni. Se ha aislado de leche bronca y carnes. En el ganado puede producir mastitis; se han reportado hallazgos ocasionales en heces de perros, gatos, roedores y ganado vacuno, caprino, porcino y aviar.

La infección por *Campylobacter jejuni* se caracteriza por vómito, dolor abdominal intenso, diarrea con sangre, enteritis y/o enterocolitis severa. Con frecuencia se presentan recaídas. *Campylobacter jejuni* es destruido por la pasteurización.

Salmonella. La salmonelosis es la más común de las ETA's, atribuidas a la leche bronca, aunque también es frecuente que esté implicada en brotes de infecciones relacionados con leche pasteurizada, en polvo ó quesos. Esto se debe a contaminaciones post-proceso.

Salmonella se encuentra en las heces de la vaca y puede llegar a la leche por partículas, pelos ó contaminación de la ubre durante el ordeño. Las cepas patógenas de *Salmonella* son muchas y la sintomatología es muy similar: gastroenteritis, cefalea, con o sin diarrea. *Salmonella* también es destruida en la pasteurización.

Yersinia enterocolítica. Esta bacteria se ha aislado de muchos alimentos de origen animal, como leche, quesos, carnes. Habita en aguas, lagos, pozos y es frecuente en mamíferos. La gastroenteritis es el síntoma más común de la yersiniasis y puede confundirse con apendicitis. *Yersinia enterocolítica* se destruye en la pasteurización.

Listeria monocytogenes. Es un organismo muy disperso en la naturaleza, principalmente en el suelo y en muchos animales. En humanos, la listeriasis es una enfermedad seria, especialmente durante la gestación, pues puede causar la muerte del producto ó del recién nacido. También se inactiva mediante la pasteurización.



Staphylococcus aureus. Es el agente más frecuente de la mastitis en el ganado vacuno y puede llegar a la leche a través de la glándula mamaria ó de infecciones en la ubre, así como por las descargas nasales ó infecciones de las manos de los ordeñadores.

Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* producen una enterotoxina cuando la leche se mantiene a temperaturas superiores a 30 °C, lo cual puede suceder fácilmente en las condiciones en que se transporta la leche en la zona de estudio. La intoxicación cursa con gran malestar, vómito, dolor abdominal. Si no es adecuadamente atendida, puede generar pérdida de electrolitos, deshidratación y, en casos severos, la muerte; los grupos de riesgo como infantes, embarazadas, personas mayores y/o desnutridas, pueden ser más afectados por este cuadro. *Staphylococcus aureus* se elimina en la pasteurización.

Brucella es una especie muy importante de cocos Gram negativos clásicos, sus dimensiones fluctúan entre las 0.3 y 0.7 µm de ancho por 0.8 a 1.2µm de largo, no presentan agrupación alguna y son inmóviles, capsulados y no esporulados, se desarrollan adecuadamente en atmosfera de 10 % de CO₂ produciendo colonias detectables en 48 a 72 h (excepto en el primocultivo que generalmente requiere de incubaciones muy prolongadas: hasta de seis a ocho semanas (es el caso de esta investigación).

Es preciso mencionar que los huéspedes naturales de este género son diversos animales: los bovinos de *B. abortus*; las cabras y las ovejas, de *B. melitensis* y, finalmente, los cerdos, de *B. suis*. El humano es un hospedero accidental de *Brucella* que le produce la "fiebre de Malta" ó "fiebre ondulante".



El género *Brucella* se subdivide en tres especies y 16 biotipos, en función de los siguientes criterios:

- * Requerimiento de CO₂ para desarrollar
- * Producción de H₂S
- * Semicuantificación de ureasa
- * Capacidad para desarrollar en presencia de diversas concentraciones de colorantes tales como la fucsina y tionina.

En algunos países se le considera como una zoonosis que el humano sólo adquiere por motivos ocupacionales: granjeros, personal de establos y mataderos, veterinarios, etc., a través de vías cutánea, inhalatoria, oral u oftálmica. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo, la brucelosis se adquiere con mayor frecuencia por ingestión de leche bronca o cruda y sus derivados destacando algunos tipos de quesos; por tal motivo, las zonas rurales fungen como las principales fuentes de origen del padecimiento, tanto para los nativos como para los turistas.

Mycobacterium. Por muchos años las micobacterias fueron un grupo abandonado de microorganismos; además de que eran extremadamente difíciles de crecer en el laboratorio se presentan numerosas dificultades para su manejo y subsecuente estudio. Nunca se utilizaron como favoritos en la investigación de la fisiología y bioquímica bacterianas, debido a que el género *Mycobacterium* incluye a los patógenos *M. tuberculosis* y *M. leprae*, que han sido problemas de salud pública desde los comienzos de la civilización, donde el hombre parece haber sufrido de infecciones micobacterianas, consideradas además como motivo de repudio hacia los enfermos.



La OMS (Organización Mundial de la Salud) estima, solamente para tuberculosis, alrededor de 8 millones de nuevos casos y 3 millones de muertes por año; se ha estimado que alrededor de 20 millones de personas sufren esta enfermedad, y ellos pueden poner en riesgo a una población de entre 50 y 100 millones por año.

El humano, al igual que muchos vertebrados, es susceptible de ser invadido por las micobacterias y pocos vertebrados parecen ser inmunes a esta invasión. Por otro lado algunas especies como *M. bovis* y *M. avium* pueden infectar diferentes géneros de animales, y pueden ser transmitidos de un género a otro incluyendo al humano. Un buen ejemplo es el que se da en las granjas con las vacas, que pueden ser infectadas con *M. bovis* quizás por otros animales silvestres y éstas a su vez infectan al humano por medio de la ingestión de leche bronca.

Las micobacterias son muy resistentes a la desecación y a la acción de algunos desinfectantes químicos en comparación con otros microorganismos no esporulados, probablemente como consecuencia de su contenido en lípidos. Son sensibles al calor húmedo, además son destruidos en el proceso de pasteurización y pueden sufrir mutaciones por la presencia de algunos fármacos en el animal o huesped.

El género *Mycobacterium* se clasifica dentro del orden *Actynomicetales*, familia *Mycobacteriaceae*; las especies principales son *M. tuberculosis* ó bacilo de Koch, que es el causante de la tuberculosis (TB), *M. bovis* causante de TB en bovinos y humanos, *M. kansasii*, *M. escrofulaceum*, *M. intracelulare*, y *M. fortuitum*, principales representantes de un grupo conocido como micobacterias no tuberculosas (MNT), atípicas o MOOT (*Mycobacterium other than tuberculosis*).



Las micobacterias pueden variar mucho en su morfología, desde formas cocoides pequeñas a largos filamentos. *M. tuberculosis* tiene una morfología característica de bacilo delgado, recto o ligeramente curvado y su tamaño es de 1 a 4 μm de largo por 0.3 - 0.5 μm de ancho. Puede presentar ramificaciones en cultivos enriquecidos. Son bacilos ácido - alcohol resistentes por lo que la tinción de Ziehl-Neelsen es útil para identificarlos.

Shigella es un bacilo inmóvil, no esporulado, anaerobio facultativo, y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. El antígeno de *Shigella* está constituido por lipopolisacáridos. La enfermedad provocada por *Shigella* (shigelosis) contribuye con el 10 % de los brotes de enfermedades de origen alimentario y está asociada a la disentería bacilar severa. También es responsable de infecciones extraintestinales.

Bioquímicamente *Shigella* no descarboxila la lisina ni fermenta la lactosa; es negativa para adonitol, citrato y DNAasa; forma gas a partir de glucosa y sacarosa, produce H_2S , y ureasa. Es muy importante detectarla para evitar una epidemia que se transmita de animales a humanos principalmente.

En México la leche debe de comercializarse para consumidor final, únicamente como leche pasteurizada. Por ello, no hay normas aplicables a la leche bronca; en las tablas I Y II se mencionan los parámetros que considere para la discusión de mis datos experimentales, basados en la NOM-091-SSA-1994, ya que en un proceso de pasteurización bien realizado se deben de eliminar los microorganismos patógenos.

Por esa razón, investigamos la posible presencia, de dichos organismos patógenos que aunque serán eliminados en la pasteurización, son un riesgo cuando la leche se consume cruda, como es el caso.



Tabla I. NOM-091-SSA1-1994. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

ESPECIFICACIONES	LIMITE MÁXIMO
Microorganismos patógenos	
<i>Salmonella spp.</i> en 25 mL	Ausente
<i>Shigella spp.</i> en 25 mL	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> en 25 mL	Ausente

Además se investigaron *Brucella spp.* y *Mycobacterium spp.*, que no están regulados debido a que serían eliminados en un buen proceso de pasteurización ya que el tiempo y costo de su detección inoperante en una detección rutinaria rápida.

Tabla II. Patógenos no regulados por la NOM-091-SSA-1994.

Microorganismos patógenos no regulados	Límite propuesto
<i>Brucella spp.</i> en 25 mL.	Ausente
<i>Mycobacterium spp.</i> en 25 mL	Ausente

A partir de la información anterior, es fácil apreciar que la pasteurización y el uso de Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad (BPHS) reducen significativamente la aparición de brotes infecciosos a través de la leche, sin embargo el riesgo permanece cuando se acostumbra el consumo de leche bronca y cuando no hay posibilidad de pasteurizar la leche; por supuesto, el problema se agrava si tampoco hay formas de conservación como la refrigeración y cuando el manejo higiénico es deficiente. Todo ello es el caso, en el Ejido Benito Juárez, municipio de Almoloya, Edo. de México.



A través de este proyecto y de los proyectos paralelos sobre calidad sanitaria y fisico-química de la leche, será posible informar a los productores y a los boteros sobre los riesgos reales del producto, para evitar infecciones y para concientizarlos sobre la necesidad de aplicar BPHS.

Las alternativas de procesamiento requieren fuentes de financiamiento para desarrollarlas y, a través de los resultados de estos proyectos se pueden apoyar las solicitudes de financiamiento ante instancias adecuadas. Finalmente, este trabajo puede contribuir al desarrollo del área de producción, a la salud y bienestar de los consumidores.



Metodología

Este trabajo es parte de un proyecto de investigación aplicada, efectuado bajo un esquema de desarrollo participativo en colaboración con los pequeños productores de leche del Ejido Benito Juárez, Almoloya, Edo. de México, comunidad que está interesada en mejorar sus posibilidades de desarrollo, mediante la interacción con el sector académico de la UNAM.

En un trabajo previo (Inclán, 2002) se encontró que uno de los factores limitantes para el desarrollo de los productores es que la única salida que tienen para el producto es la venta directa a los boteros, sin procesamiento alguno, sin valor agregado y sujetos al precio que fijen dichos intermediarios.

Una de las posibilidades es que los productores se organicen y procesen la leche en el Ejido, de manera colectiva. Para proponer los procesos adecuados, se empezó por este conjunto de trabajos de caracterización de la leche:

Atributos físico-químicos: densidad, color, olor, sabor, pH, prueba de lactofermentación, grasa, sólidos totales, sólidos no grasos, acidez y prueba del alcohol.

Calidad sanitaria: mesófilos aerobios, coliformes, hongos y levaduras y cuenta de Breed.

Determinación de microorganismos patógenos, que es precisamente este trabajo, y en el cual se investigó la presencia de bacterias patógenas reguladas en la legislación:

Salmonella spp según (NOM-114-SSA1-1994)

Shigella spp según (Palao, et. al., 1995)

Staphylococcus aureus enterotoxigénico según(NOM-115-SSA1-1994)



Así como de bacterias patógenas, importantes en leche bronca, no señaladas en la legislación aplicable:

Mycobacterium spp. (Curso de Taxonomía Mycobacteriana, 1999)

y *Brucella spp.* según (Garza et.al. 1995)

Se determinó presencia / ausencia en 25 mL de leche, excepto para *Staphylococcus aureus*, que se determinó por el método cuantitativo de Baird Parker.

Muestreo:

Se eligieron al azar 18 productores, entre los 143 que hay en el Ejido. Se muestreó la leche producida por dos vacas de cada productor y se realizaron los 3 trabajos en paralelo, es decir que todas las determinaciones fisicoquímicas, de calidad sanitaria y presencia de patógenos, se hicieron en las mismas muestras.

Antes de cada muestreo, se hizo una inspección visual sobre las condiciones de limpieza de la ubre de la vaca y las condiciones generales del establo y del ordeñador.

Las muestras se tomaron de la ordeña de la mañana, hecha por el productor. Para ello, después de la inspección visual se recibió la leche directamente de la ubre, en un frasco de vidrio estéril con tapón esmerilado, y se colocó en una hielera donde se mantuvo a una temperatura de 4° C para transportarla del Ejido al laboratorio 4-C de la Facultad de Química de la UNAM, donde se realizaron los análisis.

En todos los casos se cuidó que la temperatura de las muestras no fuera superior a 4 °C y todos los análisis se realizaron antes de que hubiesen transcurrido 4 horas desde el muestreo.



Determinación de *Salmonella* spp.

Se realizó mediante el método de 5 etapas (NOM -114-SSA-1994): pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, aislamiento diferencial e identificación. *Salmonella* debe estar ausente en 25 g de alimento.

A) Pre-enriquecimiento en caldo lactosado:

- * Se homogenizo la muestra a analizar, mediante agitación.
- * En condiciones de asepsia, se transfirieron 25 mL de leche a un matraz Erlenmeyer conteniendo 225 mL de caldo lactosado estéril y se homogenizo nuevamente.
- * Se incubo a 35 °C durante 24 h.

B) Enriquecimiento selectivo.

- * Se homogenizo el cultivo del pre-enriquecimiento en caldo lactosado.
- * Con una pipeta estéril, se transfirieron 1 mL a un tubo con 10 mL de caldo selenito-cistina.
- * Con pipeta estéril, se transfirieron 1 mL del cultivo de pre-enriquecimiento a un tubo con 10 mL de caldo tetrionato.
- * Se incubaron ambos medios a 43 °C ± 1 durante 24 h.

C) Aislamiento diferencial.

- * Se hizo a partir de los medios de enriquecimiento selectivo, cultivando en medios selectivo-diferenciales. Se homogenizaron los tubos con caldo celenito-cistina con caldo tetrionato.
- * Con una asa microbiológica estéril se tomo una muestra y se estrío por agotamiento en agar XLD.
- * Se repitió la operación para inocular todos los medios selectivo-diferenciales: agar bilis-verde brillante, agar entérico de Hektoen, agar sulfito de bismuto y agar *Salmonella-Shigella*.



- * Se incubaron todas las cajas, invertidas a 35 °C durante 24 a 48 h.
- * Se observó el desarrollo de las colonias y se seleccionaron aquellas que, por sus características macroscópicas en los medios selectivo-diferenciales, sean sospechosas de ser *Salmonella*.
- * Se purificaron al menos 2 colonias sospechosas, repitiendo el asilamiento por estría
- * Cuando se ha verificado la morfología microscópica mediante tinción de Gram y se comprobó que la colonia estaba pura, se propagó en un medio general como agar soya tripticasa ó en Agar hierro Kligler, para iniciar la diferenciación.

D) Identificación Bioquímica.

- * Se inoculó la cepa pura en los siguientes medios de cultivo, para determinar sus características y confirmar la presencia de *Salmonella spp*: Kligler o TSI, LIA y posteriormente en agar citrato de Simmons, medio SIM, caldo RM-VP, caldo malonato, caldo manitol y caldo urea o Surraco.

La interpretación se hizo siguiendo las instrucciones de los medios deshidratados y la identificación de *Salmonella* se efectuó con base en el manual de Bergey's. 8ª edición.

E) Pruebas serológicas.

- * A partir de cultivos de 24 horas, se hicieron las pruebas con suero polivalente anti-O y si es posible, con sueros específicos.



Determinación de *Shigella* spp.

También se realizó mediante enriquecimiento seguido de aislamiento en medios selectivos. Al igual que *Salmonella* y *Shigella* que deben estar ausentes en 25 g de alimento.

A) Enriquecimiento.

Se enriqueció en caldo para Gram-negativos (GN), adicionado de 0.5 g/L de novobiocina, ya que *Shigella* desarrolla satisfactoriamente en este medio, en tanto que la flora acompañante es inhibida por el antibiótico.

- * Se homogeniza la muestra mediante agitación.
- * En condiciones de asepsia se transfieren 25 mL de leche, a un matraz Erlenmeyer que contiene 225 mL de caldo GN + novobiocina, se homogeniza suavemente, y se coloca en una jarra de anaerobiosis ó en un frasco grande que contiene dentro una veladora encendida y se cierra herméticamente; al consumir el oxígeno por la flama, se obtienen las condiciones de anaerobiosis suficiente para el aislamiento de *Shigella*.
- * Se incuba a 44 °C durante 20-24 h.
- * Se agita el matraz y se toma una muestra con una asa bacteriológica estéril, que se estría en placas de agar Mac Conkey.
- * Se incuba a 35 °C durante 24 a 48 h, en las mismas condiciones de anaerobiosis.

B) Aislamiento.

- * Se examinan las placas de agar Mc Conkey y se seleccionan las colonias sospechosas: ligeramente rosas y translúcidas, con o sin bordes rugosos.
- * Se purifican al menos 2 colonias sospechosas, repitiendo el aislamiento por estría
- * Cuando se ha verificado la morfología microscópica mediante tinción de Gram y se comprueba que la colonia está pura, se propaga en un medio general como agar soya tripticasa ó en agar hierro Kliegler, para iniciar la diferenciación.



C) Identificación bioquímica

* Se inoculan las colonias sospechosas en agar TSI y en agar LIA, y posteriormente en: SIM, caldo urea, caldo CN, agar citrato de Simmons y en medio base para fermentación de carbohidratos, adicionado con adonitol, inositol, lactosa, malonato y salicina. Se incuban en las mismas condiciones de anaerobiosis, y se interpretan de acuerdo con las indicaciones de los medios.

La identificación se hizo con base en las características de *Shigella* descritas en el Bergey's. 8ª. edición.

Determinación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico. (NOM-115-SSA-1994)

A) Aislamiento y enriquecimiento.

* Se prepararon diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} en agua peptonada al 0.1 % o en buffer de fosfatos pH 7.2.

* Se transfirieron 0.1 mL de cada dilución a sendas cajas Petri con agar Baird Parker y se extiende el inóculo con una varilla de vidrio estéril en forma de "L"; se utilizo una varilla por cada dilución inoculada.

* Se mantuvieron las placas en su posición hasta que el inóculo sea completamente absorbido por el agar. Se invierten y se incuban a 35 °C por 24 h.

B) Selección y caracterización.

* Se examinaron las placas de Baird Parker para detectar las colonias típicas de *S. aureus*: colonias negras, circulares brillantes, convexas, lisas con diámetro de 1 a 2 mm, que muestran una zona circular opaca alrededor de la colonia, por la precipitación de lecitina.

* Se seleccionaron las placas que contengan entre 15 y 150 colonias típicas de

* *S. aureus*; si no es posible, se utilizaron las placas de las diluciones más altas, aunque contenían más de 150 colonias, como esta en la tabla I.



Cuando no hay placas con más de 15 colonias típicas, se utilizan la disponibles, agregando la nota de "valor estimado".

* **Tabla I.** Determinación de el número de colonias a probar:

caja con ufc	se prueban_
< 50	3
51 a 100	5
101 a 150	7

- * Se verifico la pureza mediante examen microscópico con tinción de Gram; si es necesario se repitió el aislamiento.
- * Cada una de las colonias a prueba se sembraron en BHI, se incubaron a 35 °C por 18 a 24 horas.
- * A partir del cultivo en BHI se inocularon en un tubo de caldo manitol rojo de fenol, se cubrió con una capa de 2 cm de parafina estéril y se incubo a 35 °C por 24 h.
- * A partir del cultivo de 18 a 24 horas en BHI, se hizo la prueba de la coagulasa, siguiendo las indicaciones del Staphylase kit,
- * El cultivo restante en BHI se sometió a calentamiento en baño de agua a 25 °C durante 5 minutos, se enfrió y se inoculo en placas de agar DNA, por estría. Las placas se incuban invertidas a 35 °C durante 24 h y se revelan con o-toluidina.
- * La interpretación de las pruebas se hace siguiendo las indicaciones de los medios y del kit. Las cepas de *Staphylococcus aureus* se identifican como toxigénicas cuando dan positivas las 3 pruebas: fermentación de manitol, coagulasa y termonucleasa. (Palao, et. al. 1995)



* Para determinar el número de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en la muestra, se aplicó el % de cepas positivas entre las que se probaron, al total de colonias obtenidas en el agar Baird Parker,

Determinación de *Brucella spp.*

- * Se tomó 1 mL de leche con pipeta estéril y se inoculó en un frasco que contenía medio bifásico de Ruiz Castañeda.
- * Se incubó a 37 °C por 2 meses.
- * Durante este período de incubación, se realizaron tinciones de Gram una vez por semana, para ver qué flora bacteriana que se estaba desarrollando.
- * Las colonias que crecieron en la fase sólida del medio, se sembraron en agar Mc Conkey, para aislar a los microorganismos Gram negativos de interés.
- * De las colonias que desarrollaron en agar Mc Conkey, las sospechosas de ser *Brucella* se sembraron en gelosa chocolate.
- * Las colonias que se obtuvieron en este medio se identificaron mediante pruebas bioquímicas para *Brucella*: requerimientos de CO₂, ureasa, catalasa y sensibilidad a colorantes bacteriostáticos, principalmente fucsina, tionina y cristal violeta.
- * Finalmente se confirmó serológicamente la identidad del microorganismo.



Determinación de *Mycobacterim sp.*

Este microorganismo fue difícil de cultivar, especialmente cuando no se encontraba en cantidades muy grandes; por ello se utilizó un método combinado: primero se incubó por tiempo prolongado en un medio enriquecido: Ruiz Castañeda. Al final de la incubación, se eliminó la flora que no interesa, mediante una digestión que *Mycobacterium* resiste bien y finalmente, se concentraron las células de esta bacteria por centrifugación y se observan al microscopio con tinción diferencial de Ziehl Neelsen. (Garza, et. al. y Curso de Taxonomía Mycobacteriana, 1999).

* Se partió, del mismo cultivo para detección de *Brucella* en medio de Ruiz Castañeda, cuando se examinaron las preparaciones al microscopio, se detectaron bacilos Gram positivos, sospechosos de ser *Mycobacterium*. Se hizo una preparación con tinción de Ziehl-Neelsen, además se continuó con el método.

* Al finalizar la incubación de 2 meses y después de haber resembrado para detección de *Brucella*, el cultivo se sometió a una digestión: donde se colocaron 10 mL del cultivo líquido en un tubo de centrifuga de 50 mL, estéril y se agregó la misma cantidad de la solución digestora, que contenía partes iguales de: NaOH al 4 % y N-acetil-L-cisteína al 1.0 % en solución 0.1 M de citrato de sodio dihidratado.

* La mezcla se agitó por 15 segundos en vórtex y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos.

* Se agregó solución amortiguadora de fosfatos 0.067M pH=7.0 y se centrifugó a 3750 rpm durante 20 minutos.

* Se decantó y se agregaron al sedimento, 2 mL de una solución amortiguadora de fosfatos 0.067M pH=7.0.



* Se hicieron los extendidos en portaobjetos y se fijaron en una parrilla eléctrica por 1 h. Se realiza una tinción Ziehl - Neelsen para determinar al microscopio la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes.

El hallazgo en esta preparación, de báculos cortos o largas, ácido alcohol resistentes (rojos), aislados ó en pequeños grupos irregulares, se interpreto como presencia de Mycobacterium en la leche.

Equipo

Autoclave marca Hirayama Instruments Inc., modelo HA300 MII.

Estufa de incubación marca Felisa, con doble puerta, regulada a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$

Estufa de incubación o baño de agua de temperatura controlada, a $42^{\circ}\text{C} \pm 0.5$

Microscopio óptico marca CarlZeiss, Modelo Olympus CH30

Refrigerador doméstico regulado a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Centrífuga para tubos marca International Equipment Co. Modelo IEC-HN-SII.

Campana de flujo laminar para microbiología

Cronómetro

Balanzas analítica y granataria

Potenciómetro Sargent-Welch, modelo LSX

Vórtex



Material

Frascos de vidrio de 500 mL con tapón esmerilado

Caja aislante para transportar muestras en hielo

Tubos pyrex de 50 mL, para centrifuga

Termómetro de 0 a 100 °C

Tubos de ensayo pyrex, sin labio, de 16 x 150

Tubos de ensayo pyrex, sin labio, de 13 x 100

Pipetas graduadas de 1 y 10 mL

Pipetas volumétricas de 25 mL

Matraces Erlenmeyer de 500 mL

Frascos de Ruiz Castañeda

Jarra de anaerobiosis (ó frasco de cierre hermético y veladora)

Cajas Petri desechables estériles de 15 x 100 mm

Mecheros bunsen y para campana

Asa microbiológica

Gradillas

Portaobjetos

Varillas de vidrio en ángulo recto



Medios de cultivo.

Se utilizaron medios de cultivo deshidratados preparados y esterilizados según las indicaciones del fabricante.

Agar Baird Parker(ACUMEDIA)	Caldo base púrpura de bromocresol(BIOXON)
Agar bilis-verde brillante(ACUMEDIA)	Caldo cianuro(MERCK)
Agar cerebro corazón(BIOXON)	Caldo lactosado (MERCK)
Agar citrato de Simmons(BIOXON)	Caldo malonato-rojo de fenol(BIOXON)
Agar-DNA(OXOID)	Caldo manitol-rojo de fenol(BIOXON)
Agar entérico de Hektoen(ACUMEDIA)	Caldo para Gram negativos (GN)(MERCK)
Agar lisina-hierro (LIA) (BIOXON)	Caldo selenito-cistina (DIFCO)
Agar Kligler-hierro(BIOXON)	Caldo soya tripticaseína (MERCK)
Agar McConkey(BIOXON)	Caldo tetrionato(BIOXON)
Agar para <i>Salmonella-Shigella</i> (DIBICO)	Caldo urea ó SUTRACO(BIOXON)
Agar sulfito de bismuto(BIOXON)	Infusión cerebro corazón (BHI)(BIOXON)
Agar triple azúcar-hierro (TSI)(DIBICO)	Medio SIM (MERCK)
Agar xilosa-lisina-desoxicolato(BIOXON)	Medio MRVP (BIOXON)
Base de agar sangre(BIOXON)	
Base Medio dubos(DIFCO)	
Peptona de Carne(MERCK)	



Reactivos

α -naftol(SIGMA)	N-acetil cisteína(SIGMA)
Adonitol(SIGMA)	Novobiocina
Aceite de inmersión para microscopía(MERCK)	p-dimetil-amino-benzaldehído(Erlich)
Azul de o-toluidina al 0.1 % (SIGMA)	Parafina
Citrato de sodio dihidratado(SIGMA)	Peróxido de hidrógeno(MERCK)
Colorantes de Gram(KIT S. D. PASTEUR)	Rojo de Metilo(MERCK)
Colorantes de Ziehl-Neelsen(KIT S.F. PASTEUR)	Sacarosa(SIGMA)
Fenol al 5 %(MERCK)	Sangre de cordero desfibrinada
Fosfato dibásico de potasio(JVC)	Staphylase Kit(
Fosfato monobásico de potasio(TEC. QUIMICA)	Suero anti- <i>Salmonella</i> "O" polivalente
Fucsina básica (TEC. QUIMICA)	Tionina(SIGMA)
Glicerol(J.T. BAKER)	
Hidróxido de potasio(MERCK)	
Hidróxido de sodio(MERCK)	
Inositol(MERCK)	
Lactosa(SIGMA)	



RESULTADOS

En todos los casos se indican las fechas de muestreo. Las muestras se identificaron con las iniciales del productor y 16 2 para diferenciar a las vacas de las que provienen.

Tabla 1. Presencia de *Salmonella* y *Shigella* en 25 mL de leche:

- No se detecto	+ (X) Presencia de colonias sospechosas
	(X) Número de colonias sometidas a identificación

Fecha de muestreo	Muestra	Presencia presuntiva en 25 mL de leche	
		<i>Salmonella spp.</i>	<i>Shigella spp.</i>
07-02-01	MVV1	-	+(2)
07-02-01	MVV2	-	-
07-02-01	CEV1	-	-
07-02-01	FVV1	-	-
18-02-01	FEV1	-	-
18-02-01	FEV2	-	+(1)
18-02-01	JEV1	-	-
05-03-01	CEV2	-	+(2)
05-03-01	FVV2	-	-
05-03-01	AV1	-	-
05-03-01	AV2	-	-
12-03-01	PRV1	+(2)	+(1)
12-03-01	PRV2	+(1)	-
12-03-01	APV1	-	+(1)
12-03-01	JEV2	+(2)	+(1)
26-03-01	JGV1	-	+(2)
26-03-01	JGV2	-	+(1)
26-03-01	VGV1	+(2)	+(1)
26-03-01	VGV2	+(1)	+(1)
23-04-01	CAV1	+(8)	-
23-04-01	CAV2	+(3)	-
23-04-01	VEV1	+(3)	+(1)
23-04-01	VEV2	+(2)	+(2)
09-05-01	ERV1	-	+(1)
09-05-01	ERV2	-	+(1)
09-05-01	FRV1	-	+(2)
09-05-01	FRV2	-	+(3)
13-05-01	LEV1	-	+(1)
13-05-01	LEV2	-	-
13-05-01	LAV1	-	-
04-06-01	HLV1	+(3)	-
04-06-01	HLV2	-	-
04-06-01	PAV1	+(6)	-
04-06-01	PAV2	+(1)	-



Las colonias sospechosas se purificaron en medios selectivos y después se propagaron. Antes de someterlas a identificación bioquímica se comprobaron microscópicamente la pureza y la morfología. Las cepas probadas se identificaron con la clave de la muestra y una o dos literales para diferenciarlas.

Tabla 2. Identificación bioquímica de las colonias sospechosas de *Salmonella spp.*

Muestra	Kligler		Descarboxilasas			C I T R A T O	I N D O L	M O V I L I D A D	U R E S A	Voges Proskauer	Rojo de Metillo	Identifi- cación	Confirmación Serológica
	C I L	I / C	H 2 S	L Y S	A R G								
PRV1A	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
PRV1B	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
PRV2C	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
JEV2D	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
JEV2E	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	Negativo	-
VGV1F	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
VGV1G	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
VGV2H	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
CAV1I	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
CAV1J	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
CAV1K	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
CAV1L	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
CAV1M	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
CAV1N	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Negativo	-
CAV1O	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
CAV2P	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
CAV2Q	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
CAV2R	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
VEV1S	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
VEV1T	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	Negativo	-
VEV1U	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	Negativo	-
VEV2V	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
VEV2W	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
HLV1X	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
HLV1Y	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
HLV1Z	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
PAV1AA	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	Negativo	-
PAV1BB	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	Negativo	-
PAV1CC	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
PAV1DD	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
PAV1EE	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
PAV1FF	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa
PAV2GG	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	<i>S. spp.</i>	Confirmativa



Las cepas identificadas como *Salmonella* spp fueron confirmadas serológicamente con suero polivalente anti "O".

Tabla 3. Identificación bioquímica de las colonias sospechosas de *Shigella* spp.

Muestra	Kligler			Descarboxilasa			Citrato	Indol	Movilidad	Ureasa	Voges Proskauer	Rojo de Mettlo	Identificación
	C / I / U	H / S	L / S	A / R / G	O / R / N								
MVV1A	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Negativo
MVV1B	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Negativo
FEV2C	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativo
CEV2D	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Negativo
CEV2E	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Negativo
PRV1F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativo
APV1G	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Negativo
AGV1H	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Negativo
JGV1I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativo
JGV1J	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Negativo
JGV2K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativo
VGV1L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativo
VGV2M	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Negativo
VEV1N	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativo
VEV2O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativo
VEV2P	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Negativo
ERV1Q	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Negativo
ERV2R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativo
FRV1S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativo
FRV1T	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Negativo
FRV2U	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Negativo
FRV2V	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Negativo
FRV2W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativo
LEV1X	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Negativo

Ninguna colonia, fué característica de *Shigella* spp.



Tabla 4. *Staphylococcus aureus* en agar Baird Parker.

Fecha de muestreo	Muestra	Cuenta de colonias sospechosas				Colonias sospechosas que se caracterizaron bioquímicamente
		10-1	10-2	10-3	10-4	
07-02-01	MVV1	-	-	-	-	Ninguna
07-02-01	MVV2	-	-	-	-	Ninguna
07-02-01	CEV1	-	-	-	-	Ninguna
07-02-01	FVV1	-	-	-	-	Ninguna
18-02-01	FEV1	-	-	-	-	Ninguna
18-02-01	FEV2	-	-	-	-	Ninguna
18-02-01	JEV1	-	-	-	-	Ninguna
05-03-01	CEV2	2	-	-	-	A,B
05-03-01	FVV2	-	-	-	-	Ninguna
05-03-01	AV1	1	-	-	-	C
05-03-01	AV2	4	1	-	-	D,E,F,G,,H
12-03-01	PRV1	1	-	-	-	I
12-03-01	PRV2	1	1	-	-	J,K
12-03-01	APV1	-	-	-	-	Ninguna
12-03-01	JEV2	2	-	-	-	L,M
26-03-01	JGV1	-	-	-	-	Ninguna
26-03-01	JGV2	-	-	-	-	Ninguna
26-03-01	VGV1	-	-	-	-	Ninguna
26-03-01	VGV2	-	-	-	-	Ninguna
23-04-01	CAV1	2	2	1	-	N,,N,O,P,,Q,R,S,
23-04-01	CAV2	3	1	1	-	T,U,V,W,X,Y,Z
23-04-01	VEV1	2	-	-	-	AA,BB
23-04-01	VEV2	3	-	-	-	CC,DD,EE
09-05-01	ERV1	2	-	-	-	FF,GG
09-05-01	ERV2	1	-	-	-	H'
09-05-01	FRV1	-	-	-	-	Ninguna
09-05-01	FRV2	3	2	1	-	II,JJ,KK,LL,MM,NN,OO,PP
13-05-01	LEV1	-	-	-	-	Ninguna
13-05-01	LEV2	-	-	-	-	Ninguna
13-05-01	LAV1	-	-	-	-	Ninguna
04-06-01	HLV1	-	-	-	-	Ninguna
04-06-01	HLV2	-	-	-	-	Ninguna
04-06-01	PAV1	-	-	-	-	Ninguna
04-06-01	PAV2	-	-	-	-	Ninguna

* De acuerdo al número de colonias sospechosas.

A cada colonia sospechosa que se estudio se le hizo una tinción de Gram, para confirmar las características morfológicas y microscópicas de *St. aureus*: cocos Gram positivos, no esporulados, aislados, agrupados en pares o racimos.



* Las cajas que se consideran representativas en este método son las que tienen de 10 a 150 ufc.

** Dado que en ninguna caja se obtuvieron >10 ufc, se trabajó con el 100 % de las colonias sospechosas.

Ninguna muestra presentó colonias sospechosas en 10^{-4} .

Las colonias sospechosas, se purificaron agar Baird Parker y se examinaron al microscopio con tinción de Gram para confirmar la pureza del cultivo y las características morfológicas: cocos Gram positivos, no esporulados, aislados ó agrupados en pares o racimos. También se determinó la presencia de catalasa y peroxidasa a todas las cepas, ya que son características del género *Staphylococcus*.

Finalmente, para reportar *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en ufc/mL de leche, se aplicó el porcentaje obtenido de cepas enterotoxigénicas al total de las obtenidas o a las de la caja más aceptable. Todos los resultados se consideran *valor estimado* ya que en ninguna caja hubo más de 10 ufc.

Tabla 5. Identificación bioquímica de colonias sospechosas de *S. aureus* y ufc / mL de *S. aureus* entero-toxigénico

Muestra	Colonia	Confirmación género <i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxigénico				Muestra elegida	Dil.	% toxigénicas	CONCLUSIÓN <i>S. aureus</i> enterotoxigénico ufc / mL. (4)
			pruebas			Presencia				
			Coagulasa	Manitol	termo-nucleasa					
CEV2	A	-	-	+	-	Negativa	-	-	-	
CEV2	B	+	+	+	-	Negativa	CEV2	10^{-1}	0	< 10
AV1	C	+	+	+	+	Positiva	AV1	10^{-1}	100	10
AV2	D	+	+	+	+	Positiva	-	-	-	-
AV2	E	+	+	+	+	Positiva	-	-	-	-
AV2	F	+	-	-	+	Negativa	-	-	-	-
AV2	G	-	-	-	-	Negativa	-	-	-	-



AV2	H	-	-	-	-	Negativa	AV2	10 ¹	50	20
PRV1	I	+	+	+	+	Positiva	PRV1	10 ¹	100	10
PRV2	J	-	-	-	-	Negativa	-	-	-	-
PRV2	K	+	+	+	+	Positiva	PRV2	10 ²	100	100
JEV2	L	+	+	+	+	Positiva	-	-	-	-
JEV2	M	-	-	-	-	Negativa	JEV2	10 ¹	50	10
CAV1	N	-	-	-	-	Negativa	-	-	-	-
CAV1	N	-	-	-	-	Negativa	-	-	-	-
CAV1	O	-	-	+	-	Negativa	-	-	-	-
CAV1	P	+	+	+	+	Positiva	-	-	-	-
CAV1	Q	-	-	+	-	Negativa	-	-	-	-
CAV1	R	-	-	-	-	Negativa	-	-	-	-
CAV1	S	-	-	-	-	Negativa	CAV1	10 ¹	25	10
CAV2	T	+	+	+	-	Negativa	-	-	-	-
CAV2	U	+	+	-	+	Negativa	-	-	-	-
CAV2	V	+	+	-	+	Negativa	-	-	-	-
CAV2	W	-	-	-	-	Negativa	-	-	-	-
CAV2	X	+	+	+	+	Positiva	-	-	-	-
CAV2	Y	-	-	-	-	Negativa	-	-	-	-
CAV2	Z	+	+	+	+	Positiva	CAV2	10 ¹	20	10
VEV1	AA	-	-	+	+	Negativa	-	-	-	-
VEV1	BB	+	+	+	+	Positiva	VEV1	10 ¹	50	10
VEV2	CC	-	-	-	-	Negativa	-	-	-	-
VEV2	DD	+	+	+	+	Positiva	-	-	-	-
VEV2	EE	+	+	+	+	Positiva	VEV2	10 ¹	67	20
ERV1	FF	-	-	+	-	Negativa	-	-	-	-
ERV1	GG	+	+	-	+	Negativa	ERV1	10 ¹	0	<10
ERV2	HH	+	+	+	+	Positiva	ERV2	10 ¹	100	10
FRV2	II	-	-	-	-	Negativa	-	-	-	-
FRV2	JJ	-	-	+	-	Negativa	-	-	-	-
FRV2	LL	-	-	-	-	Negativa	-	-	-	-
FRV2	MM	-	-	-	-	Negativa	-	-	-	-
FRV2	NN	-	-	-	-	Negativa	-	-	-	-
FRV2	OO	-	-	-	-	Negativa	-	-	-	-
FRV2	PP	-	-	-	-	Negativa	FRV 2	10 ¹	0	<10

Como se aprecia en la columna de cantidad de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico, sólo una muestra tiene 100 ufc/mL y las pocas que lo presentan, tienen < 20 ufc/mL. Este resultado obtenido en la investigación, está lejos de la cantidad de *St. aureus* enterotoxigénico necesaria para causar una intoxicación que es de aproximadamente 10 exp. 6 ufc/mL.



Los resultados, concuerdan con los obtenidos en el proyecto paralelo en el cual se examinaron al microscopio extendidos de la leche; en ninguno se detectaron leucocitos.

Resultados de *Brucella spp.*

Ninguna de las muestras presentó desarrollo de *Brucella spp.* en el medio bifásico Ruiz Castañeda incubado durante 2 meses a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$. En ninguna de las preparaciones realizadas cada semana y teñidas con Gram, se detectaron microorganismos sospechosos de *Brucella* y tampoco se obtuvo desarrollo en gelosa chocolate. (El control positivo fue satisfactorio).

El resultado por muestra se incluye en la tabla final.

Resultados de *Mycobacterium spp.*

Después del cultivo y la digestión, se examinó al microscopio cada preparación teñida por el método de Ziehl Neelsen, se contaron los bacilos ácido-alcohol resistentes y se interpretó de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 6. Interpretación de preparaciones microscópicas para investigación de *Mycobacterium spp.*

Bacilos encontrados	Presencia de <i>Mycobacterium spp.</i>
0 Bacilos en 100 campos	Negativa
1 a 2 Bacilos en 100 campos	Dudosa
Promedio menor de 1 bacilo por campo, contando 100 campos	+
Promedio de 1 a 10 bacilos por campo, contando al menos 50 campos.	++
Promedio mayor 10 bacilos por campo, contando al menos 20 campos	+++

Posteriormente, las muestras positivas y dudosas se resembraron en medio de Dubos, para confirmar la presencia de *Mycobacterium spp.* pero no se pudieron recuperar.



Tabla 7. Presencia de bacilos ácido alcohol resistentes en las muestras de leche.

Clave de la Muestra	Bacilos ácido alcohol resistentes			Interpretación	Confirmación en medio de Dubos	CONCLUSIÓN
	Total en 100 campos	Promedio en 50 campos	Promedio en 20 campos			
MVV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
MVV2	0	0	0	0	0	NEGATIVO
FVV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
CEV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
JEV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
FEV1	0	1.2	1.5	DUDOSA	POSITIVA	POSITIVA
FEV2	0	5.2	5.3	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA
CEV2	0	1.1	1.2	DUDOSA	POSITIVA	POSITIVA
FVV2	0	0	0	0	0	NEGATIVO
AV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
AV2	0	0	0	0	0	NEGATIVO
PRV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
PRV2	1.1	3.9	5.2	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA
APV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
JEV2	0	0	0	0	0	NEGATIVO
JGV1	0	1.1	1.2	DUDOSA	POSITIVA	POSITIVA
JGV2	1.4	3.3	5.3	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA
VGV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
VGV2	0	0	0	0	0	NEGATIVO
CAV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
CAV2	0	0	0	0	0	NEGATIVO
VEV1	0	2.2	3.9	DUDOSA	NEGATIVA	NEGATIVA
VEV2	0	2.2	3.9	DUDOSA	POSITIVA	POSITIVA
ERV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
ERV2	0	1.2	2.9	DUDOSA	POSITIVA	POSITIVA
FRV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
FRV2	0	0	0	0	0	NEGATIVO
LEV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
LEV2	0	0	0	0	0	NEGATIVO
LAV1	1.2	2.2	4.3	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA
LAV2	0	0	0	0	0	NEGATIVO
HLV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
HLV2	0	0	0	0	0	NEGATIVO
PAV1	0	0	0	0	0	NEGATIVO
PAV2	0	0	0	0	0	NEGATIVO

* Finalmente no se pudieron recuperar las cepas.



Tabla 8. Concentración de Resultados.

Muestra	Presencia de <i>Salmonella</i> spp. en 25 mL de leche	Presencia de <i>Salmonella</i> spp. en 25 mL de leche	Presencia de <i>Enterobacteriaceae aureus</i> enterotipológico n/C/mL	Presencia de <i>Brucella</i> spp. en 25 mL de leche	Presencia de <i>Mycobacterium</i> spp. en 25 mL de leche
MVV1	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
MVV2	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
FVV1	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
CEV1	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
JEV1	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
FEV1	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Presencia
FEV2	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Presencia
CEV2	Ausencia	Ausencia	< 10	Ausencia	Presencia
FVV2	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
AV1	Ausencia	Ausencia	10	Ausencia	Ausencia
AV2	Ausencia	Ausencia	20	Ausencia	Ausencia
PRV1	Presencia	Ausencia	10	Ausencia	Ausencia
PRV2	Presencia	Ausencia	100	Ausencia	Presencia
APV1	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
JEV2	Presencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
JGV1	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Presencia
JGV2	Ausencia	Ausencia	10	Ausencia	Presencia
VGV1	Presencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
VGV2	Presencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
CAV1	Presencia	Ausencia	10	Ausencia	Ausencia
CAV2	Presencia	Ausencia	10	Ausencia	Ausencia
VEV1	Presencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
VEV2	Presencia	Ausencia	20	Ausencia	Presencia
ERV1	Ausencia	Ausencia	< 10	Ausencia	Ausencia
ERV2	Ausencia	Ausencia	10	Ausencia	Presencia
FRV1	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
FRV2	Ausencia	Ausencia	< 10	Ausencia	Ausencia
LEV1	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
LEV2	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
LAV1	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Presencia
LAV2	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
HLV1	Presencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
HLV2	Ausencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
PAV1	Presencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia
PAV2	Presencia	Ausencia	-	Ausencia	Ausencia



DISCUSIÓN

Los resultados que se muestran corresponden a los 18 productores. El reporte de microorganismos investigados se basó en la NOM-091-SSA-1994.

La ordeña de la cual se reportan estos resultados es la primera que se realiza en la mañana, bajo condiciones sumamente primitivas; después, los productores llevan a el centro del pueblo los volúmenes de leche sin refrigerar, la cual se entrega a un botero que es el recolector de este producto, para posteriormente procesarla y hacer los múltiples derivados lácteos, principalmente quesos.

La calidad microbiológica depende además de tres fuentes: del interior y exterior de la ubre, pezones y otros utensilios de lechería.

De las muestras analizadas ninguna presentó *Shigella spp.* ni *Brucella spp.*

12 muestras presentan contaminación con *Salmonella spp.* que corresponden a un 34.2 %, 9 muestras presentan contaminación con *Mycobacterium spp.* que corresponde a un 25.71 % , 12 muestras están contaminadas con *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico que corresponden a un 34.2 % .

El 22.8 % de las muestras presentan entre 2 y 3 microorganismos contaminantes lo cual es un riesgo para los derivados lácteos y los consumidores de acuerdo a la NOM-091-SSA-1994, ningún patógeno debe estar presente en la leche bronca.

Pero casi un 34.2 % de las muestras cumplen la NOM-091-SSA-1994, aún sin pasteurizar, pues no se encontraron ninguno de los patógenos investigados.

La presencia o ausencia de microorganismos indicadores o patógenos en la leche, se relaciona con está directamente ó con el entorno que rodea al animal; aire, heces, utensilios, la contaminación final corresponde aun 55%.



Como muestran los resultados, la leche, recibida en recipientes estériles tiene muy poca contaminación con microorganismos patógenos. Por ello, se puede considerar que si se maneja higiénicamente y se evita contaminarla a partir del ambiente y los manipuladores se puede tener un producto de buena calidad.

Las fuentes de donde proviene la contaminación son principalmente, las heces del animal y / o el personal; esto se refleja en el porcentaje de colonias confirmadas de *Salmonella spp.* y por la presencia de *Staphylococcus aureus* como se aprecia en las tablas 4 y 5 Este tipo de contaminación desde el punto de vista cualitativo, repercute sobre todo en la elaboración de los derivados lácteo.

La calidad de la leche depende en gran manera del entorno y salud en el que se encuentre el animal, sin embargo la fuente principal de contaminación, es el manipulador que efectúa el ordeño especialmente cuando es manual como en este caso.

La utilización de estos resultados, comparados con los obtenidos de la leche obtenida de la ordeñada y manejada de manera cotidiana, es una herramienta muy importante para hacer comprender a los productores y ordeñadores, la importancia de las Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad.



ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

GENERALES:

* El 34.28 % de las muestras de leche cruda o bronca producida en el Ejido Benito Juárez, municipio de Almoloya de Juárez, Edo. de México, cumple con la NOM-091-SSA-1994 ya que no contiene bacterias patógenas de importancia en Salud Pública.

* No se detectaron *Brucella spp* ni *Shigella spp.* en las muestras.

PARTICULARES:

* Hay presencia de los patógenos regulados en las Normas Mexicanas: *Salmonella spp.*, y *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico, en la leche cruda o bronca producida en el Ejido Benito Juárez, municipio de Almoloya de Juárez, Edo. de México sin embargo el *St. aureus* enterotoxigénico no alcanzan niveles peligrosos.

* De los patógenos no regulados en las Normas Mexicanas para leche como *Mycobacterium spp.* y *Brucella spp* sólo se encontró *Mycobacterium spp* en un 25.71 % de las muestras, de la leche bronca producida en el Ejido Benito Juárez, municipio de Almoloya de Juárez, Edo. de México.

* La presencia de patógenos en la leche, es resultado de una falta de medidas higiénicas; al llevar a cabo la ordeña de una manera deficiente siendo esta la causa principal de la presencia de patógenos.



RECOMENDACIONES

- * Lo más importante para mejorar la calidad sanitaria de la leche obtenida en el Ejido Benito Juárez, municipio de Almoloya de Juárez, Edo. de México es, sin duda, la capacitación del personal que realiza la ordeña y de los productores para que tomen conciencia de la importancia de las BPH y S.
- * Como base de dicha capacitación, se proponen la comparación de resultados y la implementación de las siguientes medidas.
- * Mantener aseada la zona de ordeña, libre de heces y otros residuos que puedan contaminar el producto.
- * Antes y después de ordeñar la vaca, los pezones deben ser lavados con una solución yodada aspersada en cantidad suficiente para que permanezca en contacto unos segundos y tenga efecto.
- * Después del tiempo de contacto con la solución yodada, secar las ubres con toallas de papel individuales, desechables para absorber el agua contaminada quedando el pezón seco con menos microorganismos.



Temas sugeridos para estudios posteriores:

- * Métodos de higiene y sanidad, que permitan ordeñar al animal, sin que este expuesto a una contaminación de su entorno o propia del productor, para obtener leche de buena calidad.
- * Muestreo microbiológico de cada uno de los botes donde se recolectan estos volúmenes de leche.
- * Desarrollo de programas que impulsen a los productores a conocer técnicas, para elaborar derivados lácteos de excelente calidad, ausentes de flora bacteriana.



Apéndice
Glosario

ARG Arginina

BPHS Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad

Glu Glucosa

H₂S Producción de Sulfhídrico

LAC Lactosa

LYS Lisina

ORN Ornitina

ufc Unidades Formadoras de Colonias

Tabla A. Pruebas involucradas en la identificación de las principales especies stafilocócicas.

PRUEBA	S aureus	S epidermis	S haemolyticus	S saprophyticus	S lugdunensis	S. schleiferi
COAGULASA	+	-	-	-	-	-
FACTOR AGLUTINANTE	+	-	-	-	(+)	+
TERMONUCLEASA	+	-	-	-	-	+
UREASA	d	+	-	+	d	-
MANITOLASA	+	(+)	-	-	+	+
ORNITIDINA	-	(d)	-	-	+	-

d= 11 a 89 % cepas positivas ; () = reacción tardía



Tabla B. Medios utilizados para llevar a cabo el aislamiento de enterobacterias y *Pseudomonas*.

MEDIO	INHIBIDOR	INDICADOR	DETECTA H ₂ S
MAC CONKEY	CRISTAL VIOLETA	ROJO NEUTRO	NO
AGAR SS	SALES BILIARES	ROJO NEUTRO	SI
AGAR XLD	DESOXICOLATO	ROJO DE FENOL	SI
AGAR VB	VERDE BRILLANTE	ROJO DE FENOL	NO
HECKTOEN	SALES BILIARES	AZUL DE BROMOTIMOL	SI

Tabla C. Comportamiento de los indicadores contenidos en los medios señalados en la tabla b.

INDICADOR	COLORACIONES		
	A p H < 7	A p H de 7	A p H > 7
ROJO NEUTRO	rosa intenso	rosa claro	rosa claro
ROJO DE FENOL	rojo intenso o lila	rojo naranja	amarillo
AZUL DE BROMOTIMOL	amarillo	Rojo naranja	amarillo



**BIBLIOGRAFÍA**

1. AOAC, 1995, **Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists 11a.**
2. Bradley, R. , 1986, **Accuracy of Gercock milkfat test Bottles: Collaborative Study. J. Assoc. Off. Analytical Chemists. Vol 69, No. 5.**
3. DGCSB y S. 1997 **Guía para la producción higiénica de leche en establos con ordeño mecánico. S. S. A., México,**
4. García, O. C., . 1980 **"Características e Importancia Sanitaria de *S. aureus* en la Leche y Productos Lácteos que se consumen en el Distrito Federal", Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. U. N. A. M. Pp. 23-56.**
5. Garza Velasco Raúl. 1994 **Manual de Prácticas Bacteriológicas. Departamento de Biología. División de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Química, UNAM. Pp. 73-99.**
6. Hamann, J. 1997 **Potential of specific milk composition variables for cow health management. Livestock Production Science Vol. 48. Pp.201-208.**
7. Henderson, J. O. 1988 **Fabricación de Productos Lácteos, Capítulo 1, Calidad de la Leche, Editorial Acribia, España. Pp. 3-51.**
8. Luciano Hernández Gómez, et. al. 2000 **"Curso de taxonomía micobacteriana" Facultad de Química, UNAM..**
9. Martínez L. Luis et.al. 1999**"La Calidad Microbiológica de la Leche Destinada a la Fabricación de Queso". Alimentaria . Pp. 53-60.**



-
10. Mc. Faddin, Jean F., 1993 " Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica". Edit. Medica Panamericana, 2a. edición. México.
 11. Newlander J.A. et.al. 1981 Chemistry and testing of dairy products, Editorial Avi Publishing Company, Ind., Westport, Connecticut. Pp. 1-116.
 12. Nieto, V. Z. 1999 Productos Lácteos Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. Pp. 2-45.
 13. Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Leche Pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud México.
 14. Norma Oficial Mexicana NOM- 114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para determinar *Salmonella* en Alimentos. Secretaría de Salud México.
 15. Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *staphylococcus aureus* en alimentos. Secretaría de Salud México.
 16. Palao, M.T et.al. 1998 Tecnologías Microbiológicas de Aplicación en el Control de Calidad de Alimentos. Departamento de Biología, Fac. de Química, UNAM. Pp. 103-108.
 17. Pascual, A. Ma. Del R. 1992 Microbiología Alimentaria (Metodología analítica, para alimentos y bebidas). Editorial España. Pp. 205-228.
-



18. Spreer Edgar, 1995 **Lactología Industrial**, capítulo 2, leche cruda, Editorial España
Pp. 7-60.

19. S.T. Cowan, et.al., 1986 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 8a.
Edición, The Williams and Wilkins company / Baltimore. Pp. 290 – 295 y 891- 892.

Bibliografía Electrónica

20. Internet.2000. <http://www.generoshigella.com.mx>.

