

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



Evaluación de la calidad microbiológica de leche pasteurizada de mayor
consumo en la ciudad de Tijuana, B.C.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA

QI. Ericka Gabriela Vázquez Ojeda

Dra. María Eugenia Pérez Morales
DIRECTORA DE TESIS

Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala
CO-DIRECTORA DE TESIS

Tijuana, Baja California; Noviembre 2015

RESUMEN

Antecedentes

La leche se compone 87% de agua, 3.5% de proteínas, 3.5 a 4.0% de lípidos, 5.1% de carbohidratos y 0.7% de sales minerales, estas proporciones son adecuadas para la alimentación y funcionan exclusivamente como fuente de alimento, es aceptada universalmente por su alto valor nutrimental. Por su composición corre el riesgo de contaminarse por microorganismos, afectando de forma negativa la calidad higiénica y nutricional del producto y consecuentemente, afectan la salud pública y la economía de cualquier país.

Objetivo: Determinar la concentración microbiana en las diferentes marcas de leche pasteurizada de mayor consumo en la ciudad de Tijuana B.C., de acuerdo a la NOM-243-SSA1-2010, y establecer las especificaciones de calidad microbiológica en la distribución del perfil sanitario de las leches pasteurizadas.

Metodología: Es un estudio experimental. Las muestras de leche pasteurizada (n=72) se analizaron en el período de mayo-septiembre del 2014, en las 9 delegaciones que conforman la ciudad de Tijuana, B.C. Las muestras se sometieron a un análisis de calidad microbiológica utilizando el método de Petrifilm 3M para cuantificar la presencia de Coliformes totales, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*.

Resultados: El 23.61% de las muestras presentaron contaminación microbiana. Se detectó la presencia de Coliformes totales en 19.44% de las muestras siendo así el de mayor proporción encontrado, en el 6.94% de las muestras se aisló *Staphylococcus aureus*, hubo ausencia de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* en el 100% de las muestras.

Conclusiones: Se demostró que existen bacterias resistentes a la pasteurización y es importante eliminarlas antes del consumo, sin embargo, la leche pasteurizada distribuida en la ciudad de Tijuana, B.C. es de buena calidad, es importante mantener la cadena de frío para evitar el crecimiento bacteriano.

Palabras clave: *Calidad de leche pasteurizada, calidad microbiológica, calidad microbiológica de leche.*

ABSTRACT

Background: Milk is composed by 87% water, 3.5 % protein, 3.5 to 4.0 % lipids, 5.1% carbohydrates and 0.7% minerals, these components are in suitable proportions acting as a great source of food, and is universally accepted because of its high nutritional value. Due to this composition, milk is at high risk of contamination by microorganisms, negatively affecting the hygienic and nutritional quality of the product and, consequently, affecting public health and economy of any country.

Objective: To determine the microbiological concentration in pasteurized milk the most consumed brands distributed in Tijuana B.C, as NOM-243-SSA1-2010 indicates and to establish the quality specifications in the distribution of sanitary profile in pasteurized milk.

Methodology: This was an experimental study. The pasteurized milk samples (n=72) were analyzed in may-september 2014 period, around the 9 districts that conform Tijuana, B.C. Samples were subjected to a microbiological quality analysis with Petrifilm 3M method, to identify the presence of Total coliforms, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes*.

Results: 23.61% of the samples presented microbial contamination, Total coliforms were detected in 19.44% of samples, and this is the highest percentage found, followed by *Staphylococcus aureus* in 6.94% of samples and no detection of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* in 100% of samples.

Conclusions: We demonstrated that there are pasteurization resistant bacteria and it is important to eliminate them before consumption, although the quality of pasteurized milk distributed in the city is of great quality, it is important to maintain the cold chain to avoid bacterial growth.

Key words: *Pasteurized milk quality, microbiological quality, microbiological quality of milk.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y hermana, que nunca dudaron de mi capacidad, que con su apoyo y sus enseñanzas he logrado cumplir una meta más en mi vida profesional, gracias a ellos comprendí que el esfuerzo y la dedicación son la clave del éxito.

A mi prometido, por siempre escuchar con paciencia cuando tenía dudas, por sus consejos, por tanto amor y cariño y por siempre estar a mi lado en cada decisión que he tomado.

A mis maestras la Dra. María Eugenia y la Dra. Lily Hurtado, gracias por aceptarme, por tener paciencia, por las horas y horas dedicadas a este proyecto, por actuar de maestras y psicólogas a la vez. Por nunca negarme tiempo cuando lo necesitaba, por todas las dudas aclaradas y sobre todo por la confianza que depositaron en mí desde el primer momento en que decidí estudiar una maestría. Gracias por sus consejos, experiencias y sobre todo por compartir su sabiduría conmigo.

Al maestro Luis Alcántara, por el tiempo dedicado, por sus consejos, por su experiencia compartida, por siempre tener una sonrisa en el rostro para recibirme.

A mis amigas, que siempre han estado apoyándome en todos los proyectos que he iniciado, sin duda ustedes completan mi vida, gracias por las risas, los consejos y las porras, por hacerme sentir la más lista en mis momentos de confusión.

A todas las personas que de una u otra forma estuvieron involucrados en este proyecto, muchísimas gracias, hicieron que este proceso fuera muy divertido.

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	ix
ANTECEDENTES	1
Clasificación de la leche según su contenido en grasa	2
Consumo mundial de leche.....	3
Consumo de leche en México	4
Producción de leche en México	6
Calidad microbiológica de leche en el mundo	7
Contaminación en la leche.....	15
Pasteurización	17
Pasteurización de la leche	18
Métodos de identificación microbiológicos	18
Descripción de los métodos alternativos y complementarios de identificación de microorganismos	20
Métodos inmunológicos para identificación microbiana.....	23

JUSTIFICACIÓN	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
METODOLOGÍA	30
PROCEDIMIENTO	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
LIMITACIONES.....	57
FORTALEZAS	58
CONCLUSIONES.....	59
RECOMENDACIONES.....	61
REFERENCIAS.....	62
ANEXOS	68
ANEXO I Métodos físicos	68
Determinación de Temperatura	68
Determinación de pH	69
ANEXO II Análisis microbiológicos.....	70
Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.....	70

Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de <i>Salmonella</i> en alimentos.....	73
Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en alimentos.....	75
Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de <i>Listeria monocytogenes</i>	77
ANEXO III Métodos alternativos	78
Preparación de muestras (método general)	78
Placas Petrifilm 3M Staph Express para recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	79
Placas Petrifilm 3M para detección de <i>Listeria</i> ambiental	81
Placas Petrifilm 3M <i>Salmonella</i> express	83
Placas Petrifilm para recuento de Coliformes totales	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Métodos directos, químicos e inmunológicos, ventajas y desventajas	19
2	Diseño experimental para la toma de muestras	34
3	Resultado de las 72 muestras de leche pasteurizada analizadas	41
4	Contaminación microbiológica por marca de leche	43
5	Muestras contaminadas microbiológicamente por delegación	45
6	Muestras contaminadas microbiológicamente por tipo de envase	47
7	Muestras contaminadas microbiológicamente por tipo de leche	48
8	Muestras contaminadas con Coliformes totales	50
9	Muestras contaminadas con Coliformes totales dentro y fuera de especificación	51
10	Muestras contaminadas con <i>Staphylococcus aureus</i>	52
11	Muestras dentro y fuera de especificación para <i>Staphylococcus aureus</i>	53
12	Efecto de la temperatura en la presencia de microorganismos detectados en las muestras de leche	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Campana de flujo laminar del laboratorio de análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la UABC.	36
2	Diluciones de muestras listas para ser analizadas	37
3	Placas Petrifilm para <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y Coliformes totales	38
4	Incubadora del laboratorio de análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la UABC.	38
5	Metodología para <i>Salmonella spp.</i> , en Petrifilm 3M	39
6	Incubadora de análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la UABC.	39
7	Conteo de Coliformes totales, <i>Staphylococcus aureus</i> , detección de <i>Listeria monocytogenes</i> y detección de <i>Salmonella spp.</i>	40

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura	Descripción	Página
1	Presencia de microorganismos en muestras de leche	44
2	Porcentaje de muestras de leche contaminadas por delegación	46
3	Muestras de leche contaminadas por tipo de envase	47
4	Tipo de leche con mayor contaminación microbiana	49
5	Presencia de Coliformes totales en leche	50
6	Muestras contaminadas dentro y fuera de especificación para Coliformes totales	51
7	Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en leche	52
8	Muestras contaminadas dentro y fuera de especificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	53

ANTECEDENTES

La leche es un líquido blanquecino y opaco producido por la secreción de las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos. Sus componentes se encuentran en forma y proporciones adecuadas para la alimentación de las crías. La leche funciona exclusivamente como fuente de alimento, y debido a esto es aceptada universalmente por su alto valor nutrimental, ya que a su vez contiene diferentes sustancias que actúan como parte fundamental de los sistemas inmunológicos y de protección de un recién nacido. La leche presenta propiedades particulares debido a la composición e interacciones entre sus constituyentes. Algunas de las características físicas de ella son el peso específico, tensión superficial, calor específico y temperatura de congelamiento. El color blanco de la leche se debe principalmente a la dispersión en el espectro visible provocada por los glóbulos de grasa, a las micelas de la caseína y al fosfato de calcio coloidal. Al ser homogeneizada los glóbulos grandes se rompen y produce un gran número de glóbulos pequeños provocando la blancura de la leche. La acidez titulable normal se debe a la presencia de los grupos ionizables de las proteínas. El pH debe ser de 6.5 a 6.7 y cualquier cambio de esta indica alteración del producto, los pH menores se deben a una acidificación microbiana y los mayores a una posible infección en la vaca, como la mastitis (Badui, 2006).

La composición media de la leche es 87% de agua, 3.5% de proteínas, de 3.5 a 4.0% de lípidos, 5.1% de carbohidratos y 0.7% de sales minerales. Así mismo contiene cantidades moderadas de vitaminas hidrosolubles tales como vitamina C, B₁, B₂, B₆,

niacina, ácido pantoténico, ácido fólico, biotina, colina e inositol y vitaminas hidrosolubles como la vitamina A, D, E y K (Pascual, 2000).

Dado que la leche y sus derivados son alimentos que cumplen con todos los nutrimentos esenciales para el ser humano, forman parte de su dieta diaria. Por lo anterior las enfermedades nutricionales no se presentan en personas que consumen este tipo de alimentos. Al contrario cuando la leche no está disponible en la dieta diaria de las personas, se presentan las deficiencias nutricionales (Magariños, 2001).

La leche tiene el riesgo de contaminarse desde su síntesis en la glándula mamaria hasta la llegada al consumidor. Estos riesgos son, la contaminación por microorganismos, alteración físico-química, absorción de olores extraños, y contaminación por sustancias químicas, etcétera. Todos los riesgos, ya sea en forma aislada o en conjunto, contribuyen en forma negativa sobre la calidad higiénica y nutricional del producto y, consecuentemente, afectan la salud pública y la economía de cualquier país (Arrieta LEM, 2001).

Clasificación de la leche según su contenido de grasa

La leche es consumida por personas de todas las edades, sin embargo, se requiere diferente composición para cumplir con las necesidades de todos.

1. Leche entera: Es la más cercana al alimento original, y por eso es la que más grasa tiene. Por lo regular, debe contener al menos 30 gramos por litro de grasa butírica (la grasa propia de la leche).
2. Parcialmente descremada: Esta leche debe tener un contenido de grasa butírica de 6 a 28 gramos por litro. En esta categoría se incluye la leche semidescremada.

3. Descremada: Esta leche debe tener un contenido de grasa butírica de 5 gramos por litro, como máximo. (PROFECO, 2012)

El desafío para quienes trabajan en el sector lechero no sólo es producir mayor cantidad de leche sino, también, de alta calidad higiénica, y para ello deben contemplarse aspectos fundamentales, como lo son la higiene microbiológica, la higiene química y la higiene estética (Magariños, 2001).

Consumo mundial de leche

El consumo mundial de leche y otros productos lácteos líquidos alcanzó un máximo histórico de 258,000 millones de litros en 2008. En 2009 el consumo aumentó en más de 4,000 millones de litros o 1.6% desde el 2007. Este crecimiento se produjo a pesar del aumento brusco en los precios en los últimos años, que hizo aumentar los precios de la leche hasta en un 75% en algunos mercados, hasta estabilizarse a finales de 2008 (Índice Lácteo, 2009). En la última década el crecimiento del consumo mundial de lácteos dependió en gran medida del aumento de la población mundial. Aproximadamente el 70% de los aumentos en la demanda se atribuyen a este factor, en tanto que el crecimiento del consumo por habitante explicó el 30% restante. Actualmente la mayor parte del consumo de lácteos está concentrado en los países industrializados, como consecuencia de su mayor poder adquisitivo y de su mayor consumo per cápita, el mayor ritmo de crecimiento de la población en los países en desarrollo ha contribuido a que la participación de estos últimos se haya incrementado en las últimas décadas (Secretaría de Economía, 2012).

Consumo de leche en México

México es el octavo país en consumo global de leche y otros productos lácteos, después de India, China, Estados Unidos, Pakistán, Argentina, Brasil y Rusia, según el Índice lácteo Internacional (2011). En el país, el volumen de productos lácteos en 2011 fue de alrededor de 12 mil millones de litros. Estos productos lácteos incluyen leche fluida o pasteurizada, leche para bebés, yogurt líquido, leche evaporada, leche saborizada, crema líquida, leche condensada. El consumo per cápita de la leche en México fue de 66 litros por año en 2011 (Índice lácteo Internacional, 2012).

Producción de leche en el mundo

Alrededor de 150 millones de hogares en todo el mundo se dedican a la producción de leche. En la mayoría de los países en desarrollo, la leche es producida por pequeños agricultores y la producción lechera contribuye a los medios de vida, la seguridad alimentaria, la nutrición de los hogares y es una fuente importante de ingresos en efectivo (Faye et al. 2012).

En los últimos decenios, los países en desarrollo han aumentado su participación en la producción lechera mundial. Este crecimiento se debe principalmente al aumento del número de animales destinados a la producción, y no al de la productividad por cabeza (Banco Mundial. 2011).

La producción mundial de leche alcanzó en 2012 a 765,000 toneladas, de las cuales aproximadamente el 83% corresponde a leche de vaca, la que habría crecido un 1,9% respecto al 2011. La India es el mayor productor mundial de leche, con el 16 % de la

producción total, seguido por los Estados Unidos de América, China, Pakistán y Brasil (Fundación para la Promoción y el Desarrollo de la Cadena Láctea Argentina, 2012).

Producción de leche en México

En México la producción de leche representa la quinta parte del valor total de la producción nacional pecuaria, siendo la tercera en importancia superando a la producción de cerdo y huevo, por lo que se deduce que esta es una actividad rentable, ya que de otra manera no se explica el importante crecimiento que se ha generado (Secretaría de Economía, 2012). Según cifras del Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), durante el período 2003-2011 la producción nacional de leche de bovino ha tenido una tasa media de crecimiento de 1.3% (SAGARPA, 2013). En el sector lácteo, ha aumentado tanto la producción como las importaciones debido al crecimiento doméstico de la demanda tanto de consumidores como de procesadores. Las importaciones de productos lácteos han incrementado, México tiene el segundo mercado más grande de Latinoamérica. Baja California está ubicada en la zona árida del país, el estado a pesar de no tener tanta disponibilidad de agua como en otras regiones del sur del país, es un importante productor de leche. Entre 2003 y 2010, la zona árida y semiárida (Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Chihuahua, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas) registraron un crecimiento a una tasa anual promedio de 1.9% (Secretaría de Economía, 2013).

Calidad microbiológica de leche en el mundo

Una amplia variedad de productos son elaborados con leche pasteurizada, como queso, yogurt y leche líquida. En Europa el consumo de leche cruda ha incrementado su demanda, sin embargo esto viene acompañado por el riesgo de ingerir bacterias patógenas que pueden afectar la salud. Por esta razón la clave para prevenir la contaminación en la leche es la pasteurización (Bianchi et al., 2014).

En Estados Unidos los casos de intoxicación por contaminación de alimentos son un problema de gran preocupación. En los productos lácteos a pesar de utilizar la pasteurización y ser altamente regulados siguen provocando problemas de salud. De 1990 a 2006 se presentaron 83 casos de intoxicación en Estados Unidos el 43.6% de ellos fueron relacionados al consumo de productos fabricados a partir de leche pasteurizada. En Alemania de 2006 a 2007 se presentó un brote de Listeriosis por consumir queso hecho a partir de leche pasteurizada. (Miller et al., 2012).

Tremonte et al. (2014), realizaron un estudio acerca del consumo de leche no pasteurizada en Italia ya que se ha incrementado debido a la tendencia de ingerir alimentos naturales, sin conservadores y para ayudar al comercio local de algunas regiones. Sin embargo, no se ha comprobado que el ingerir ésta haya dejado de ser peligroso para la humanidad, debido al gran número de bacterias patógenas que pueden crecer en ella, inclusive a bajas temperaturas de conservación.

Las enfermedades causadas por alimentos siguen siendo un gran problema para la salud pública, siendo *Staphylococcus aureus* el agente etiológico con mayor frecuencia como causante de ellas (Manfredi et al., 2010).

Otro problema de salud pública son las infecciones por *Listeria monocytogenes*, cuya tasa de incidencia es baja, sin embargo la de mortalidad es alta (30%), algunas enfermedades que se asocian a esta bacteria son: meningitis, encefalitis, septicemias y abortos, entre otros. En Colombia, se reportó en 1996 una incidencia de la presencia de *L. monocytogenes* en leche de 34% para leche cruda y 2% para leche pasteurizada, porcentajes muy altos en comparación con la prevalencia en leche cruda en países europeos como Holanda con 4.4% y Francia con 4.6%, y en Estados Unidos con 12% (Burbano et al., 2003).

Salmonella spp. son otra causante de intoxicaciones alimentarias, esta puede colonizar a la mayoría de los animales, entre ellos aves, reptiles, ganado, roedores y al ser humano (Carrascal et al., 2007). La OMS ha establecido que las especies de mayor frecuencia que afectan al ser humano son *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, las cuales cada vez son más resistentes a antibióticos comunes, se multiplican a bajas temperaturas y responden efectivamente a los cambios físicos y químicos en el medio (Villarreal et al., 2008).

En una revisión sistemática (Vázquez-Ojeda et al., 2014) que se realizó, con el propósito de conocer la calidad microbiológica de leche cruda y pasteurizada en diferentes partes del mundo, y en el que se incluyeron estudios publicados de 2003 a 2013, se encontraron 11 artículos relacionados con la composición de la leche y calidad microbiológica de la misma y a continuación se describen:

Luigi et al. (2013), analizaron la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada en Venezuela. Evaluaron los microorganismos indicadores de calidad sanitaria según la metodología sugerida por las normas oficiales del país. Las

bacterias que rebasaron los límites permisibles por la norma fueron los coliformes totales y coliformes termotolerantes. El 92% de las muestras cumplen con los límites de bacterias aerobias mesófilas, el 45% de las muestras están por encima de los límites permisibles para coliformes totales y el 72% rebasa los límites establecidos. En leche cruda 72.5% de las muestras están por encima de los límites para bacterias aeróbias mesófilas, indicando condiciones higiénicas deficientes.

Agarwal et al. (2012), evaluaron el perfil microbiológico de la leche distribuida en la India, de vendedores locales, leche pasteurizada y leche ultra-pasteurizada. Se utilizó la metodología de hervir y almacenar los productos y determinar su perfil microbiológico antes y después. Así mismo se determinó su perfil microbiológico después de hervir y almacenar las muestras a temperatura ambiente y en refrigeración. Se aislaron coliformes, hongos y levaduras en todas las muestras de los vendedores locales así como en las muestras de leche pasteurizada. Se identificó *Staphylococcus aureus* en el 62% de las muestras de leche, *Escherichia coli* en el 80%. *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* y *Listeria monocytogenes* no se aislaron en las muestras analizadas. Después de hervir la leche, la carga bacteriana se redujo, y se eliminaron bacterias tales como *E. coli* y *S. aureus*. Se recomienda hervir la leche cruda y pasteurizada antes de consumirse y refrigerarse para mantener una buena calidad microbiológica en ésta.

Garedew et al. (2012), llevaron a cabo una identificación de bacterias Gram-negativas en los puntos críticos de control de leche cruda y pasteurizada consumida en la ciudad de Gondar, se recolectaron muestras en los puntos críticos de control de la producción hasta el consumo, se practicaron cultivos bacteriológicos estándar y

ensayos bioquímicos para aislar bacterias patógenas en las muestras de leche. Se identificaron 54 especies diferentes de bacterias, entre ellas *E. coli* (29.6%), *Pseudomonas aeruginosa* (18.5%) y *Klebsiella pneumoniae* (16.6%), siendo estas las bacterias patógenas más recurrentes, sin embargo en las muestras de leche pasteurizada no se aislaron, aun teniendo diferente vida de anaquel. Se concluye que es necesario mantener un apropiado sistema sanitario e higiénico, así como medidas estrictas en cada punto crítico de control para salvaguardar a los consumidores de enfermedades causadas por bacterias patógenas.

Elizondo-Salazar et al. (2010), llevaron a cabo un estudio para evaluar los sistemas de pasteurización en 6 granjas lecheras en Pennsylvania, se recolectaron muestras dos veces por día durante 15 días. Se realizaron pruebas de cuenta en placa estándar, cuenta de *Staphylococcus* coagulasa-negativo, coliformes, no coliformes Gram negativos, se buscó la presencia de *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*. Antes de la pasteurización 68% de las muestras tuvieron una cuenta en placa estándar de <200,000 ufc/ml (unidades formadoras de colonia por mililitro de muestra) y 39% de las muestras contenían <100,000 ufc /ml de coliformes. Después de la pasteurización, 96% de las muestras obtuvieron una cuenta en placa estándar de <20,000 ufc/ml y 92% de las muestras obtuvieron una cuenta de coliformes de <100 ufc/ml. Se comprueba que el proceso de pasteurización es efectivo para disminuir la carga microbiana, sin embargo la leche que se utiliza como alimento para los terneros tuvo un aumento significativo en la carga microbiana después de la pasteurización, por lo que se concluye que los instrumentos de transporte y alimentación de leche para alimento de ternero están contaminados.

Hassan et al. (2009), llevaron a cabo un análisis de 4 muestras de diferentes marcas de leche ultrapasteurizada, esto para valorar la vida de anaquel de los productos, se realizaron pruebas fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales durante 12 semanas para identificar la variación. Los resultados mostraron una disminución de pH a lo largo del tiempo, así como sedimentación de la grasa, indicando así la desnaturalización de las proteínas por falta de una buena homogeneización. No hubo crecimiento microbiano durante las 12 semanas, el análisis sensorial detectó un cambio significativo en ese tiempo. Todos estos factores afectan la vida de anaquel de los productos.

Shojaei y Yadollahi (2008), analizaron leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada distribuida en la ciudad de Shahrekord, Irán, las cuales se sometieron a pruebas fisicoquímicas y microbiológicas, buscando la presencia de *E. coli*, debido a que su presencia indica contaminación fecal. Se recolectaron 81 muestras de las tres diferentes tipos de leche, los porcentajes de grasa fueron entre 2.6 y 2.8% para los tres tipos, el contenido de proteína en los tres fue similar entre 3.1 y 3.5% para todas las muestras, la acidez de la leche cruda no cumplió con el estándar internacional. La leche cruda y pasteurizada están por arriba de los límites de concentración bacteriana establecidos en estándares mundiales, lo cual indica un mal manejo y procesamiento de éste producto. Se hace necesario el control para reducir el riesgo de contaminación de leche en la ciudad.

Chatterjee et al. (2006), llevaron a cabo un estudio para analizar la calidad de la leche distribuida en la ciudad de Tarakeswar, India. Se tomaron 10 muestras de leche cruda y 10 de leche pasteurizada, se analizaron por el método de cuenta en placa y

reducción de azul de metileno. El 60% de las muestras de leche cruda resultaron de mala calidad, de las colonias bacterianas aisladas se identificó *E. coli*. El 100% de las muestras de leche pasteurizada fueron de buena calidad.

Ayele et al. (2005), evaluaron la presencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en leche pasteurizada comercializada en la República Checa en tres granjas de la región, en donde se buscó el microorganismo en las heces fecales de vacas, en leche cruda y pasteurizada. En el 1.6% de las leches pasteurizadas comercializadas se detectó el microorganismo, en la granja A se detectó el microorganismo en el 3.0% de las vacas, en la granja B se encontró en el 12% y en la granja C no se detectó *Mycobacterium*. Se cree que la contaminación de la leche por este microorganismo es por contacto con heces fecales, sin embargo en el presente estudio una vaca resultó negativa a la presencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en las heces fecales y la leche ordeñada de esta resultó PCR-positivo. Lo que indica que una vaca infectada subclínicamente puede transmitir el microorganismo de manera directa a la leche sin haberla contaminado por contacto con heces fecales. Con estos resultados, se sugiere que se realice más investigación de este microorganismo dado que se sospecha que es el causante de la enfermedad de Crohn, que es una condición inflamatoria crónica del intestino en los humanos.

Fromm y Boor (2004), llevaron a cabo una investigación en 3 plantas lecheras del estado de Nueva York, para identificar bacterias Gram-positivas directamente relacionadas con el deterioro de la vida de anaquel de la leche. Se aplicaron pruebas químicas, microbiológicas y organolépticas en los días 1, 7, 14 y 17 después de procesadas las muestras, para identificar el deterioro de la leche durante su vida de

anaquel. Las bacterias psicrótrofas Gram-positivas detectadas incluyeron *Paenibacillus spp.*, *Bacillus spp.* y *Microbacterium spp.* Esto indica la necesidad de desarrollar estrategias para eliminar las bacterias contaminantes de la leche y así extender la vida de anaquel del producto.

O'Reilly et al. (2004), realizaron un estudio para determinar la incidencia de *Mycobacterium paratuberculosis* en leche cruda y leche pasteurizada comercializada en Irlanda. Se analizaron 389 muestras de leche cruda y 357 de leche pasteurizada, se sometieron las muestras a dos pruebas para *M. paratuberculosis*, separación inmunomagnética-PCR (IMS-PCR) para detectar la presencia de células, vivas o muertas; y descontaminación química y cultivo para confirmar la presencia de *M. paratuberculosis* viables. Se detectó DNA de *M. paratuberculosis* por IMS-PCR en 12% de las muestras de leche cruda y en 9% de las muestras de leche pasteurizada. El DNA se presenta ocasionalmente en bajos niveles en ambas leche cruda y pasteurizada de vaca, no se detectó *M. paratuberculosis* viables en leche pasteurizada para comercializar, por lo que los procedimientos de pasteurización son considerados efectivos.

Valbuena et al. (2004), realizaron un estudio para evaluar la calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizadas distribuidas en Maracaibo, Venezuela. Se analizaron 216 muestras obtenidas en panaderías y supermercados de la ciudad. Se practicaron pruebas de recuento de aeróbios mesófilos, coliformes, termodúricos, psicrótrofos, pruebas para evaluar la eficiencia de la pasteurización, determinación de inhibidores, pH y acidez titulable. El 14.5% de las muestras están por arriba del límite establecido por la Comisión Venezolana de Normas Industriales en recuento de

aeróbios mesófilos, el 50.93% de las muestras están por arriba de los límites establecidos por COVENIN en coliformes. Las muestras presentaron alta carga de termodúricos y psicrotrofos. Más del 99% de las muestras indicaron un marcado sobrecalentamiento en el procesamiento térmico, por lo que se concluye que las muestras fueron contaminadas con mucha frecuencia después de la pasteurización.

En México, no se han encontrado estudios de calidad microbiológica de leche pasteurizada. Existe un estudio acerca de calidad microbiológica en leche cruda y otros productos lácteos como yogur, quesos y crema.

Arrieta (2011), realizó un estudio en donde analizó la calidad microbiológica en muestras de leche cruda y productos lácteos producidos en la ciudad de Morelia de manera artesanal. Los resultados arrojaron elevadas cifras de contaminación de bacterias, entre ellas *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.*, *Listeria spp.*, *Yersinia spp.*, *Brucella spp.*, *Mycobacterium spp.* y *Staphylococcus aureus*. Se recomienda mejorar las prácticas de higiene para la elaboración de todos estos productos y una segunda investigación que valide estos resultados siendo estos los únicos estudios realizados en la ciudad.

Debido a que no existe una norma internacional que establezca el número de microorganismos permisibles en leche en la cual basarse, cada país tiene sus propias normas por lo que no es posible comparar la calidad de la leche con un solo valor aceptable. La calidad microbiológica de la leche determinada en los estudios de esta revisión sistemática en su mayoría no cumplió con los límites establecidos por sus

respectivas normas, indicando un alto riesgo de adquirir enfermedades de transmisión por alimentos. Se concluye que la leche fue contaminada después de ser pasteurizada por el mal manejo, almacenamiento, transporte y conservación del producto en anaquel.

Contaminación en la leche.

Por ser la leche un producto biológico rico en carbohidratos, grasas, proteínas, minerales, vitaminas y oligoelementos, y por poseer un pH 6.5-6.7 (cerca de la neutralidad), se constituye en un medio adecuado para la multiplicación de la mayoría de las bacterias contaminantes (Garedew et al., 2012). Aunque sea recogida asépticamente y proceda de un animal sano, siempre contiene células provenientes de la sangre y de la glándula mamaria, además de los diversos microorganismos que habitan normalmente en el canal del pezón (Calderón et al., 2012). La actividad bacteriana en la leche puede deberse a contaminación, provocando alteración en la composición, desarrollo de patógenos, formación de toxinas, etcétera, o bien por inoculación, como ocurre en los procesos de elaboración de los productos fermentados. Una alta carga de bacterias contaminantes en la leche disminuye la vida útil de los productos elaborados, desmejora la calidad organoléptica y nutricional, e interviene en los procesos de fermentación ácido láctica y en la coagulación enzimática promoviendo el deterioro o proteólisis de las caseínas. La tasa de multiplicación de las bacterias es dependiente de la temperatura, y cuanto más controlado se encuentre el ambiente de las vacas durante el ordeño, menor número de organismos podrán ingresar y colonizar el canal del pezón (Ravelli et al., 2004).

Patógenos comunes en la leche

Las enfermedades provocadas por leche y productos lácteos contaminados han ocurrido desde que las vacas fueron ordeñadas por primera vez. El contenido de microorganismos presentes en la leche depende principalmente de la limpieza de las máquinas, utensilios de ordeño y las prácticas de ordeño utilizadas (Carrillo, 2004).

Los microorganismos que provocan enfermedades relacionadas con los lácteos son los siguientes:

Salmonella: la salmonelosis es la enfermedad más común transmitida en leche cruda. Este microorganismo se encuentra en las heces y lechos de animales y es atrapada por el pelo o ubres de las vacas. Este microorganismo se inactiva mediante la pasteurización.

Listeria monocytogenes: esta bacteria ampliamente esparcida se encuentra en el lodo. La listeriosis en humanos es peligrosa para las mujeres embarazadas principalmente, provocando abortos o la muerte del infante justo después de nacer. También se inactiva con la pasteurización.

Staphylococcus aureus: esta bacteria es la causa común de mastitis en las vacas, esta bacteria puede contaminar la leche durante el ordeño mediante las ubres o contaminarse por el ordeñador. La incidencia de contaminación por esta bacteria se ve altamente reducida por la pasteurización.

Escherichia coli 0157: H7: esta bacteria se encuentra comúnmente en las heces de los animales, siendo esta la principal fuente de contaminación de la leche cruda. La pasteurización destruye este microorganismo (Pascual et al., 2000).

Pasteurización

La pasteurización es el tratamiento térmico para eliminar microorganismos presentes y para garantizar la vida de anaquel deseada para la bebida. El proceso de pasteurización cuidadosamente diseñado retiene los sabores y nutrientes en el producto (Elizondo-Salazar, 2010).

Existen diferentes tipos de pasteurización, estos son diseñados de acuerdo a la necesidad del producto lácteo, así mismo se diferencian por el tiempo y temperatura a la que es sometido el producto:

1. Pasteurización VAT: También conocido como pasteurización en lote, el producto es sometido a una temperatura de 63°C (145°F) durante 30 minutos.
 2. Pasteurización HTST (*High temperature short time pasteurization*): El producto es sometido a una temperatura de 72°C (161°F) durante 15 segundos.
 3. Ultra pasteurización UP: El producto es sometido a una temperatura de 89°C (191°F) durante 1.0 segundo.
 4. Esterilización UHT (*Ultra-high temperature*): El producto es sometido a una temperatura de 138°C (280°F) durante 2.0 segundos.
- (Badui, 2006).

Para bebidas envasadas asépticamente y que no requieren refrigeración, es necesario que las condiciones asépticas sean garantizadas durante todo el proceso, evitando cualquier re-contaminación del producto pasteurizado, este producto no necesitará refrigeración hasta ser abierto, por lo que se convierte en un producto estable durante su almacenamiento. Otros sistemas de pasteurización están diseñados para el llenado en frío, donde la bebida envasada higiénicamente es

distribuida en la cadena de frío, o para llenado en caliente de bebidas deben ser enviadas en condiciones ambientales (Índice lácteo, 2013).

Pasteurización de la leche

La leche posee un pH superior a 4.5. Por tanto, es necesario el uso de temperaturas más severas para alargar su vida útil. No obstante, pueden aplicarse también temperaturas más suaves, pero su vida útil menguará. Si se lleva a cabo la pasteurización a temperaturas más bajas, su vida útil puede llegar a ser de dos a tres semanas mientras que la que sí se procesa mediante la pasteurización UHT, incrementa su vida útil por más de cuatro meses, incluso puede almacenarse sin refrigeración (Badui, 2006).

Métodos de identificación microbiológicos

En la actualidad la identificación bacteriana se sigue realizando por métodos directos, basados en las características fenotípicas, pues su realización y costo los hace más accesibles. Sin embargo se han desarrollado métodos alternativos y complementarios que ayudan a la identificación definitiva de los microorganismos, estos basados en la identificación genética o proteica (Bou et al., 2011).

Existen métodos directos que se utilizan para la cuantificación de microorganismos en muestras de alimentos y métodos indirectos que además de cuantificar, auxilian en la identificación de contaminantes tanto químicos como microbiológicos, la Tabla 1 resume los métodos directos, químicos e inmunológicos utilizados así como sus ventajas y desventajas.

Tabla 1. Métodos directos, químicos e inmunológicos, ventajas y desventajas

		Ventajas	Desventajas
Métodos directos	Viables: Diluciones Recuento en placa Totales: Microscopio Preparaciones secas Preparaciones húmedas	Recuento de células vivas Exactitud Alta sensibilidad Utilización de medios selectivos Económico Sencillo Rápido	Diferentes condiciones de incubación Dependen del tamaño del inóculo No distingue células vivas y muertas No distingue células pequeñas No hay precisión Algunas células no se tiñen La movilidad de algunas células dificulta el conteo Baja densidad de células no permite el conteo
Métodos físicos	Turbidez: Nefelometría Espectrofotómetro	Rápido Fácil Económico	No diferencia entre células vivas de muertas Su sensibilidad es limitada
Métodos químicos	Nucleasa Termoestable	Detección de enterotoxina de <i>Staphylococcus aureus</i> a concentraciones muy bajas	Específico únicamente para <i>Staphylococcus aureus</i>
	Lisado de Limulus	Método rápido Detección de células viables y no viables Detección de todas las enterobacterias	Únicamente detecta enterobacterias
	Sondas de ácidos nucleicos	Específico Sensible	Equipo especializado Alto costo Capacitación
	PCR	Método rápido Detección de concentración de microorganismos muy bajas Especificidad alta	Equipo especializado Alto costo Capacitación
	Medida de ATP	Método rápido Mínimo requerimiento de equipo Sensible	El ATP no está relacionado directamente con microorganismos Laborioso
	Sustratos fluoro y cromogénicos: Epifluorescencia	Método rápido	Alto costo Equipo especializado
Métodos inmunológicos	Complejo Ag-Ac: Aglutinado Precipitación	Método rápido Utilización de cantidades mínimas de reactivos Sensible	Laborioso No flexible
	Fluorocromo: Citometría de flujo	Método rápido Alta especificidad	Equipo especializado Alto costo Capacitación
	Radioisótopos	Alta especificidad Sensible	Disposición de residuos altamente peligroso Alto costo Capacitación
	Enzimas	Método rápido Sensible Alta especificidad Cantidades pequeñas de reactivos	Equipo especializado Capacitación

Descripción de los métodos alternativos y complementarios de identificación de microorganismos

En la industria alimentaria, se ha incrementado la necesidad de utilizar pruebas que detecten con mayor rapidez y eficiencia la cantidad de microorganismos en los puntos críticos de control del proceso, debido a que la inspección final del producto no es suficiente (Leotta,2009).

Métodos químicos para identificación bacteriana:

1. Citometría

Conocida como FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en un líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Tiene la capacidad de medir múltiples parámetros celulares: como el tamaño, forma y complejidad de una célula, así como cualquier componente celular o función que pueda ser marcada por un fluorocromo. (Laguado J., 2007)

2. Epifluorescencia

FISH o Hibridación in situ Fluorescente. Detecta secuencias de ácidos nucleicos en células o tejidos preservados mediante el empleo de una sonda marcada con un fluorocromo, la cual va dirigida hacia un lugar específico del cromosoma y que emite fluorescencia que puede ser observada por medio de un microscopio. Se fundamenta en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para hibridarse entre sí, es decir, la existencia de determinada secuencia de ADN o ARN, que resulta complementaria con otra secuencia a través de puentes de hidrógeno formados entre las bases adenina-timina (DNA) o uracilo (RNA) y citosina-guanina (DNA y

RNA). Permite la identificación y visualización de la célula microbiana individual dentro de su microhábitat natural o tejido en el que se encuentre presente

Entre las aplicaciones de la epifluorescencia se encuentran (Rodríguez et al. 2013):

- ❖ Identificación de microorganismos de interés clínico
- ❖ Ambientes acuáticos
- ❖ Plantas de tratamiento
- ❖ Biorremediación
- ❖ Simbiosis

3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica *in vitro* utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre dos regiones cuya secuencia se conoce. Es un método que detecta un número extremadamente bajo de microorganismos con una cierta rapidez basado en la producción de copias de genes específicos de un microorganismo en cuestión. Sus aplicaciones abarcan en medicina la identificación de enfermedades, en microbiología para la detección de microorganismos sospechosos las cuales no están presentes en cantidades suficientes para su identificación por métodos clásicos, así como en el área forense y genética, entre otros (Villareal et al. 2008).

4. Nucleasa Termoestable

La endonucleasa puede detectarse experimentalmente como un índice de la presencia de *S. aureus*, incluso en concentraciones demasiado bajas en la producción de enterotoxinas aun cuando no haya producido una cantidad

detectable. En los alimentos, se utiliza como una prueba indirecta de la presencia de grandes cantidades de *Staphylococcus aureus*, así como de la posible formación de enterotoxina estafilocócica. (Jay et al. 2005).

5. Lisado de Limulus

Es un método in vitro que detecta con alta sensibilidad la presencia de endotoxinas bacterianas, las endotoxinas son compuestos químicos complejos que se encuentran exclusivamente en la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram-negativas . Se basa en la aglutinación de extractos de amebocito de sangre de Limulus (cangrejo de mar) producido por cantidades del orden de picogramos de lipopolisacáridos. El grado de activación está relacionado con la concentración de endotoxinas presente en la muestra y se determina por 3 métodos in vitro:

- ✓ Gelificación. El método de gel-clot es el ensayo clásico y el más elemental entre los métodos del LAL. La reacción desarrollada en el tubo de ensayo es esencialmente la misma que ocurre in vivo en la hemolinfa del cangrejo herradura frente a las endotoxinas. Es el ensayo menos susceptible a inhibición y requiere de un equipamiento más sencillo y menos costoso.
- ✓ Cromogénicos Estos métodos se fundamentan en el empleo de un sustrato cromogénico sintético incoloro. El sustrato está compuesto por un pequeño péptido unido por la arginina C-terminal a una molécula del cromóforo p-nitroanilina (pNA). Una vez activada la cascada del LAL, la enzima coaguladora provoca la liberación de la molécula de pNA de color amarillo.

El desarrollo de la coloración amarilla es proporcional a la concentración de endotoxinas en la muestra.

- ✓ Turbidimétricos. Estos métodos se fundamentan por el aumento de la turbidez en la mezcla de reacción provocado por el incremento de la concentración de coagulina insoluble, la cual se monitorea espectrofotométricamente. La proporción del aumento de turbidez está relacionada con la concentración de endotoxinas en la muestra. Los métodos turbidimétricos son los más sensibles, capaces de detectar hasta 0.001 UE/mL. (Jay et al. 2005).

Métodos inmunológicos para identificación microbiana

1. Técnicas de aglutinación. Cuando el antígenos se encuentra unido o formando parte de células, bacterias o partículas, la reacción Ag-Ac se puede detectar y cuantificar por el aglutinado celular o bacteriano formado.
2. Técnicas de fluorescencia y citometría de flujo. Para la realización de estas técnicas el anticuerpo se marca con un fluorocromo detectándose la formación del complejo Ag-Ac por la fluorescencia emitida.
3. Técnicas de radioinmunoensayo: En estas técnicas al anticuerpo se une un isótopo radiactivo siendo posible la cuantificación del complejo Ag-Ac a través de la radiactividad emitida (Juste et al. 2008).

JUSTIFICACIÓN

La leche es uno de los alimentos más completos para la población humana, por ello es esencial en la nutrición de los individuos, principalmente la de niños en crecimiento, por lo que son importantes las estrategias de seguridad alimentaria respecto a su producción, distribución y comercio. Según los informes del Índice Lácteo de TetraPak Internacional, la demanda de los productos lácteos líquidos se aceleró entre 2008 y 2011 con una tasa anual de 2.5% y entre los principales consumidores están los continentes de Asia, África y América Latina (Índice lácteo, 2009).

El consumo global de leche y sus productos se proyecta que aumente su tasa anual de 2.5% a 2.9% entre 2011 y 2014. El consumo per cápita de leche en México ascendió a 66 litros en el 2012 quedando en la octava posición. (Índice lácteo, 2012).

Por el contenido tan alto de nutrimentos, y por ser un alimento tan completo, con un pH casi neutro y alta actividad acuosa, la leche está sujeta a contaminaciones microbiológicas que la hacen un producto altamente perecedero (Badui, 2006).

El control de calidad de los alimentos constituye una especialidad en la actualidad a causa de las exigencias del consumidor; generando su desarrollo en la industria lechera, para la producción de leche entera. La calidad microbiológica de la leche está determinada por microorganismos marcadores presentes en los alimentos y es un indicador sobre la manipulación inadecuada de la materia prima o el producto terminado, dado que su presencia puede ser considerada como un peligro para el consumidor (Signorini et al., 2008).

Por lo anterior y para aportar a las mejores prácticas del manejo, preservación y conservación de la leche pasteurizada que se consume en Tijuana, se realizará un estudio que contribuya al desarrollo de la práctica analítica microbiológica en el control de calidad de las diferentes marcas de leche pasteurizada, comercializadas en la ciudad de Tijuana, B.C.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los microorganismos encontrados en los alimentos, por malas prácticas de higiene traen consigo enfermedades como intoxicaciones e infecciones. Este problema de salud puede durar desde unas horas a días, en algunos casos estos no son tratados con el cuidado necesario y puede llegar a provocar la muerte (Pascual, 2000).

Específicamente hablando de la leche; este producto es un alimento básico en la nutrición de todo mexicano principalmente en niños, siendo estos y las personas de la tercera edad los grupos más vulnerables a enfermedades (SAGARPA, 2013).

Por el largo proceso que lleva la producción de leche, en todo su recorrido existen diversos puntos de control de contaminación, como la manipulación y el trasiego que se lleva a cabo en el proceso de transporte y almacenamiento, los cuales si no se les da el cuidado e higiene necesarios la pasteurización no es suficiente para eliminar la carga microbiana peligrosa para el ser humano (Moreno et al., 2007).

En países como Argentina, Venezuela y Colombia entre otros, se han realizado estudios sobre el control microbiológico en lácteos, sin embargo en su gran mayoría no son de producto terminado si no de la leche cruda, o productos derivados como quesos y yogurt (Signorini et al., 2008; Moreno et al., 2007; Valbuena et al., 2004).

La búsqueda de información acerca de la calidad microbiológica en leche pasteurizada, en la ciudad de Tijuana B.C. no ha sido satisfactoria, no se han encontrado artículos de estudios realizados en la ciudad ni en el país.

Por lo anterior, se hace necesario generar estudios que permitan dar a conocer la calidad microbiológica de la leche pasteurizada que se comercializa en la ciudad de

Tijuana, B.C., proponiendo la metodología que establecen los protocolos de análisis y control de calidad basados en las Normas Oficiales Mexicanas vigentes

OBJETIVO GENERAL

Determinar la concentración microbiana en las diferentes marcas de leche pasteurizada de mayor consumo en la ciudad de Tijuana B.C., de acuerdo a la NOM-243-SSA1-2010, para establecer las especificaciones de calidad microbiológica en la distribución del perfil sanitario de las leches pasteurizadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las marcas de leche pasteurizada de mayor consumo en la ciudad de Tijuana, B.C. mediante una investigación de campo a través de encuestas en la comunidad.
2. Comparar el método de cuantificación microbiana de la NOM-243-SSA1-2010 con el método miniaturizado 3M Petrifilm para establecer el método más eficiente en la determinación de la concentración microbiana en leche pasteurizada.
3. Determinar el perfil sanitario de leche pasteurizada de mayor consumo en la región de acuerdo a los valores permisibles en la NOM-243-SSA1-2010, mediante el análisis de los resultados para establecer la calidad microbiológica de la leche.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio experimental en las 9 delegaciones de la ciudad de Tijuana Baja California (Centenario, Cerro Colorado, La Mesa, La Presa, Mesa de Otay, Playas de Tijuana, San Antonio de los Buenos, Sánchez Taboada y Zona Centro) durante los meses de mayo a septiembre de 2014 para tomar en cuenta la estación del año cálida (primavera-verano) y la temporada templada (otoño). Las muestras que se incluyeron en el muestreo fueron de leche pasteurizada, dependiendo de la marca, presentación y tipo de leche de mayor consumo, se excluyeron del estudio el resto de los productos lácteos como: formulaciones, yogurt, cremas o bebidas lácteas fermentadas.. Para definir las marcas de leche pasteurizada a analizar se realizaron encuestas a adultos mayores de 20 años, comprando en el supermercado, mientras que para etapa experimental las muestras serán de las dos marcas de leche pasteurizada de mayor consumo en la ciudad de Tijuana.

Tamaño de la muestra

Para determinar las marcas de leche pasteurizada de mayor consumo se considera el cálculo del tamaño de muestra poblacional mediante el siguiente procedimiento estadístico:

El número de encuestas a realizar, se determinará en base a la siguiente fórmula:

$$n = \frac{t^2 \times p(1-p)}{m^2}$$

Donde:

n = tamaño de la muestra requerido

t = nivel de confianza de 95% (valor estándar de 1.96)

p = homogeneidad estimada de la zona del proyecto (0.5)

m = margen de error de 5% (valor estándar de 0.05)

Considerando un 95% de confianza, homogeneidad de 0.5, margen de error de 5%, efecto del diseño e imprevistos

Habiendo sido considerados estos criterios, el resultado es de 806 encuestas distribuidas en las 9 delegaciones encontradas en la ciudad de Tijuana.

Análisis estadístico

- i. El instrumento de medición para determinar las marcas de leche pasteurizadas de mayor consumo en la región, se validó mediante la aplicación de éste en dos periodos de tiempo con una semana de diferencia. El análisis estadístico de correlación y regresión multivariable.
- ii. El análisis estadístico de los resultados se trató mediante el programa Microsoft Excel 2010 para determinar el perfil sanitario de las muestras analizadas.
- iii. Los resultados se expresan mediante tablas descriptivas y gráficas de pastel.

PROCEDIMIENTO

Análisis de mercado

El análisis de mercado se realizó visitando los mercados más populares de la región e identificando la variedad de marcas disponibles a la venta para consumo de la población de la ciudad de Tijuana. B.C.

Población

Mediante el cálculo de tamaño de muestra, se determinó el número de encuestas a aplicar (806 encuestas), en las 9 delegaciones de la ciudad de Tijuana, B.C.

Estas encuestas se aplicaron en los supermercados de mayor concurrencia en la ciudad, aproximadamente fueron 90 por delegación, se aplicó a personas mayores de 20 años.

Elaboración del instrumento de consumo de leche

La elaboración del instrumento de consumo de leche se realizó con el objetivo de conocer cuáles son las preferencias de la población en cuanto a la compra de leche pasteurizada, marca, envase, volumen y tipo de leche.

Este instrumento se aplicó a 20 personas en dos ocasiones con diferencia de una semana entre una aplicación y otra, con el fin de validar el cuestionario antes de la aplicación a la población.

Muestreo de leche

Después de aplicado el instrumento de consumo de leche y de acuerdo a los resultados obtenidos, se inició la toma de muestras mensual a partir de mayo de 2014 como se indica en la tabla de diseño experimental y se terminó de muestrear en el mes de septiembre del 2014.

Tabla 2. Diseño experimental para la toma de muestras mensual

Marca	Presentación	Entera	Baja en grasa (2%)
Marca 1	Galón	1	1
	½ galón	1	1
	1 litro	1	1
	Tetrapak	1	1
Marca 2	Galón	1	1
	½ galón	1	1
	1 litro	1	1
	Tetrapak	1	1
Total de muestras	16	8	8

Variables

Variables independientes

1. Temperatura de: medio de transporte, conservación, incubación de la muestra y procedencia de la muestra.
2. pH del medio de cultivo.
3. Acidez de la muestra.

Variables dependientes

1. Concentración microbiana de la muestra

Análisis microbiológico de leche pasteurizada

Para el análisis microbiológico de las muestras de leche se trabajó con todas las medidas de seguridad e higiene que marcan las normas de bioseguridad en el laboratorio de análisis microbiológico. En la figura No. 1 se muestra el área de trabajo donde se realizaron las pruebas para identificación de bacterias presentes en leche pasteurizada.



Figura No. 1. Campana de flujo laminar del laboratorio de análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

El análisis microbiológico de la leche se realizó con el método de Petrifilm 3M, el cual es un método validado, y consta de placas deshidratadas de medio selectivo para cada bacteria, el cual se rehidrata con la cantidad específica de muestra para cada medio, este método se describe en el Anexo III Métodos alternativos. En esta ocasión se utilizó en la búsqueda de coliformes totales, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*. Este método es eficaz para la reducción de tiempos de resultados

Conteo total de microorganismos

Las muestras se procesaron para su análisis por diluciones como lo marca la Norma Oficial Mexicana *NOM-110-SSA1-1994*, Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. En la figura No. 2 se observan los frascos con las diluciones preparadas así como las placas Petrifilm 3M para ser inoculadas.



Figura No. 2. Diluciones de muestras, para ser analizadas.

Se realizó el análisis de acuerdo a lo estipulado en las indicaciones de cada una de las diferentes placas de Petrifilm 3M para la identificación de cada microorganismo. La identificación de Coliformes totales, y *Staphylococcus aureus* se realizaba inoculando 1 ml de dilución en las placas Petrifilm 3M, la identificación de *Listeria monocytogenes* se realiza inoculando 3 ml de dilución en la placa Petrifilm 3M, con incubación a 37°C por 24 horas (Figura 3).

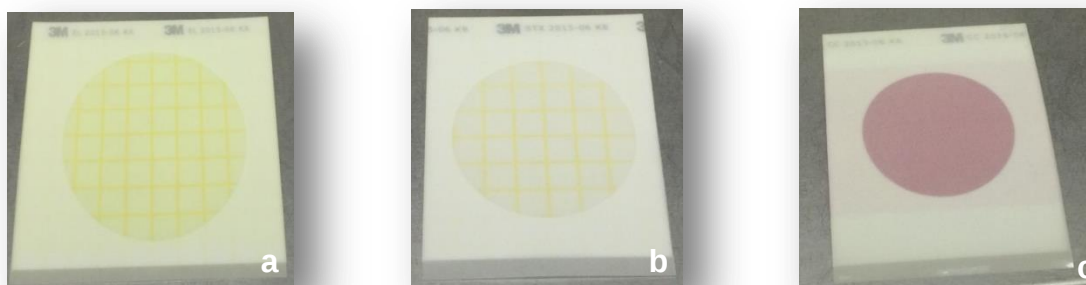


Figura No. 3. Placas Petrifilm 3M para a) *Listeria monocytogenes*, b) *Staphylococcus aureus* y c) coliformes totales.



Figura No. 4. Incubadora del laboratorio de análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

El análisis para la identificación de *Salmonella spp.* se realiza preparando una dilución de 25 ml de leche en 225 ml de caldo selenito cistina o caldo tetrationato, se incuba por 24 horas y transcurrido este tiempo se procede a inocular en la placa Petrifilm 3M para *Salmonella spp.* la placa se rehidrata con 1 ml de agua esterilizada, se deja

reposar para su completa rehidratación y se estría. La incubación se realiza durante 24 horas a 41.5°C.

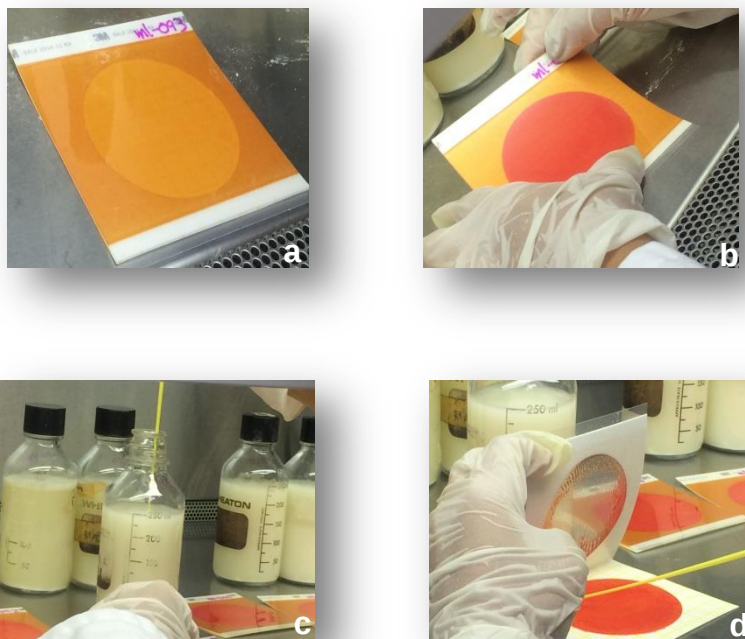


Figura No. 5. a) Placa Petrifilm 3M para *Salmonella spp.*, b) Rehidratación de placa, c) Toma de asada de muestra y d) Estriado de muestra



Figura No. 6. Incubadora del laboratorio de análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

Después de transcurrido el tiempo necesario para cada microorganismo, se realiza el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) (Figura 7).

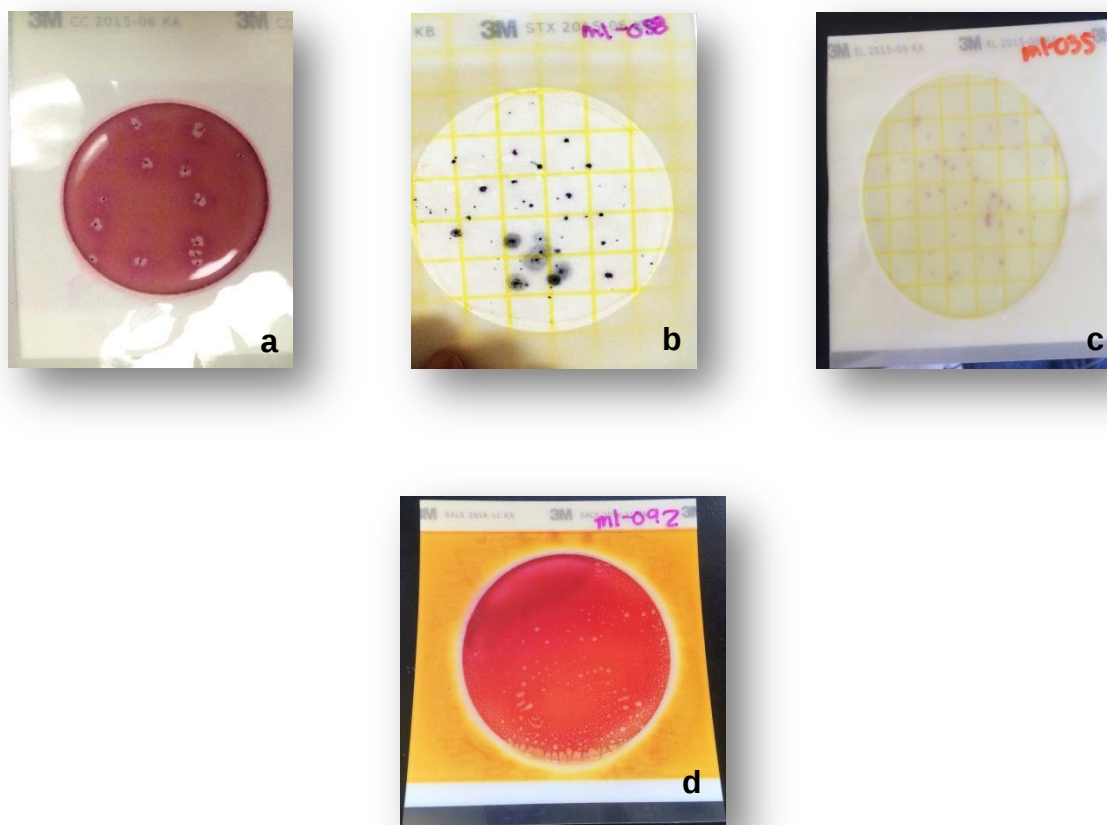


Figura No. 7. a) Conteo de Coliformes totales, b) Conteo de *Staphylococcus aureus*, c) Detección de *Listeria Monocytogenes* y d) Detección de *Salmonella spp.*

Análisis estadístico

El análisis se realizó utilizando Microsoft Excel para la comparación de las marcas de leche, microbiológicamente, por envase, por marca, por tipo de leche y delegación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de leche pasteurizada consistió en la recolección de 72 muestras distribuidas en las 9 delegaciones de la ciudad de Tijuana, en un lapso de tiempo entre Mayo y Septiembre del 2013. Se seleccionaron las dos marcas de mayor consumo en la ciudad, en la tabla no 3 se muestran los resultados obtenidos

Tabla No. 3 Resultados de las 72 muestras de leche pasteurizada analizadas

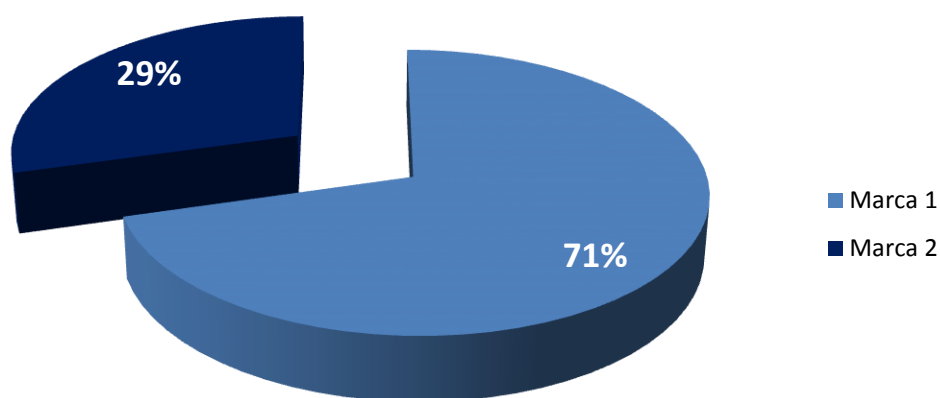
No. De muestra	Delegación	Marca	Tipo	Envase	Temperatura (°C)	pH (6.6-6.8)	Coliformes totales (<20Ufc/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i> (<10 Ufc/ml)	Salmonella spp (Ausencia)	<i>Listeria monocytogenes</i> (Ausencia)
ML-001	La Mesa	M1	E	Galón	6	6.8	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-002	La Mesa	M1	L	Galón	6	6.7	3	0	Ausencia	Ausencia
ML-003	La Mesa	M1	E	1/2 gal	8	6.8	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-004	La Mesa	M1	L	1/2 gal	6	6.8	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-005	La Mesa	M1	E	1 litro	8	6.6	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-006	La Mesa	M1	L	1 litro	14	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-007	La Mesa	M1	E	Tetrapak	17	6.6	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-008	La Mesa	M1	L	Tetrapak	17	6.6	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-009	Sánchez T	M2	E	Galón	6	6.9	13	0	Ausencia	Ausencia
ML-010	Sánchez T	M2	L	Galón	6	6.9	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-011	Sánchez T	M2	E	1/2 gal	6	6.9	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-012	Sánchez T	M2	L	1/2 gal	6	6.9	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-013	Sánchez T	M2	E	1 litro	5	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-014	Sánchez T	M2	L	1 litro	5	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-015	Sánchez T	M2	E	Tetrapak	6	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-016	Sánchez T	M2	L	Tetrapak	7	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-017	Cerro Col	M1	E	Galón	9	6.7	3	0	Ausencia	Ausencia
ML-018	Cerro Col	M1	L	Galón	10	6.7	1	0	Ausencia	Ausencia
ML-019	Cerro Col	M1	E	1/2 gal	10	6.7	10	0	Ausencia	Ausencia
ML-020	Cerro Col	M1	L	1/2 gal	8	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-021	Cerro Col	M1	E	1 litro	6	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-022	Cerro Col	M1	L	1 litro	6	6.8	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-023	Cerro Col	M1	E	Tetrapak	7	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-024	Cerro Col	M1	L	Tetrapak	7	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-025	La Presa	M2	E	Galón	4	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-026	La Presa	M2	L	Galón	4	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-027	La Presa	M2	E	1/2 gal	5	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-028	La Presa	M2	L	1/2 gal	5	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-029	La Presa	M2	E	1 litro	6	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-030	La Presa	M2	L	1 litro	7	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-031	La Presa	M2	E	Tetrapak	7	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-032	La Presa	M2	L	Tetrapak	6	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia

ML-033	Centro	M1	E	Galón	4	6.7	3	0	Ausencia	Ausencia
ML-034	Centro	M1	L	Galón	4	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-035	Centro	M1	E	1/2 gal	4	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-036	Centro	M1	L	1/2 gal	4	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-037	Centro	M1	E	1 litro	7	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-038	Centro	M1	L	1 litro	7	6.8	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-039	Centro	M1	E	Tetrapak	6	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-040	Centro	M1	L	Tetrapak	8	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-041	Centenario	M2	E	Galón	5	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-042	Centenario	M2	L	Galón	5	6.8	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-043	Centenario	M2	E	1/2 gal	6	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-044	Centenario	M2	L	1/2 gal	5	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-045	Centenario	M2	E	1 litro	6	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-046	Centenario	M2	L	1 litro	6	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-047	Centenario	M2	E	Tetrapak	6	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-048	Centenario	M2	L	Tetrapak	7	6.6	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-049	Playas	M1	E	Galón	4	6.7	22	11	Ausencia	Ausencia
ML-050	Playas	M1	L	Galón	4	6.7	0	1	Ausencia	Ausencia
ML-051	Playas	M1	E	1/2 gal	6	6.7	0	3	Ausencia	Ausencia
ML-052	Playas	M1	L	1/2 gal	5	6.8	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-053	Playas	M1	E	1 litro	5	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-054	Playas	M1	L	1 litro	6	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-055	Playas	M1	E	Tetrapak	6	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-056	Playas	M1	L	Tetrapak	6	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-057	S. A. B.	M2	E	Galón	4	6.7	Incontables	0	Ausencia	Ausencia
ML-058	S. A. B.	M2	L	Galón	4	6.7	1	16	Ausencia	Ausencia
ML-059	S. A. B.	M2	E	1/2 gal	5	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-060	S. A. B.	M2	L	1/2 gal	4	6.7	0	12	Ausencia	Ausencia
ML-061	S. A. B.	M2	E	1 litro	6	6.8	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-062	S. A. B.	M2	L	1 litro	7	6.9	1	0	Ausencia	Ausencia
ML-063	S. A. B.	M2	E	Tetrapak	7	6.8	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-064	S. A. B.	M2	L	Tetrapak	6	6.8	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-065	Otay	M1	E	Galón	6	6.7	40	0	Ausencia	Ausencia
ML-066	Otay	M1	L	Galón	6	6.8	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-067	Otay	M1	E	1/2 gal	8	6.8	Incontables	0	Ausencia	Ausencia
ML-068	Otay	M1	L	1/2 gal	7	6.8	8	0	Ausencia	Ausencia
ML-069	Otay	M1	E	1 litro	11	6.7	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-070	Otay	M1	L	1 litro	11	6.7	2	0	Ausencia	Ausencia
ML-071	Otay	M1	E	Tetrapak	15	6.6	0	0	Ausencia	Ausencia
ML-072	Otay	M1	L	Tetrapak	15	6.6	0	0	Ausencia	Ausencia

En la tabla no. 4 se observan los resultados obtenidos de muestras contaminadas con respecto a la marca específicamente, donde la Marca 1 obtuvo mayor número de muestras contaminadas, representando el 72% de las muestras contaminadas.

Tabla No. 4 Contaminación microbiológica por marca de leche

	Analizadas	Contaminadas	% del total de muestras	% de muestras contaminadas
Marca 1	36	12	16.67	70.59
Marca 2	36	5	6.94	29.41
Total	72	17	23.61	100.00



Gráfica No. 1. Presencia de microorganismos en muestras de

En la gráfica No.1 se muestran los porcentajes de muestras contaminadas de las dos marcas de leche analizadas, donde se aprecia que la Marca 1 tuvo un porcentaje de 71% mientras que la Marca 2 obtuvo solo el 29% de muestras contaminadas, cabe

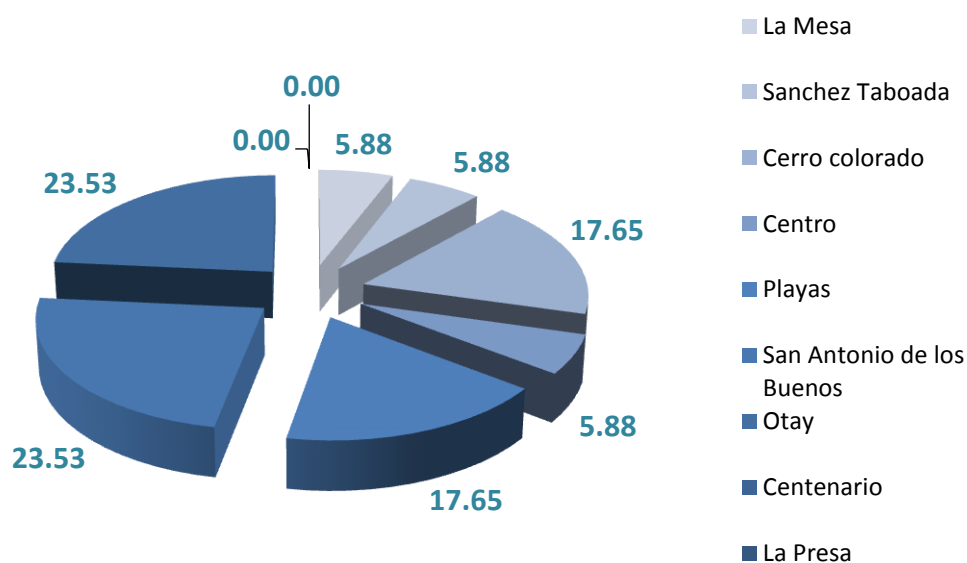
destacar que esto equivale a un total de 17 muestras contaminadas de las 72 muestras analizadas.

Analizando los resultados por delegaciones, se encuentra que las muestras de la delegación de San Antonio de los Buenos y Otay fueron las que presentaron mayor contaminación de la leche, de las 8 muestras analizadas, 4 estuvieron contaminadas, que representan cada una el 23.53% del total de muestras contaminadas. seguida de la delegación Playas y Cerro Colorado, con un total de 3 muestras contaminadas de 8 que se analizaron por delegación, seguido están las delegaciones La Mesa, Centro y Sánchez Taboada con una muestra contaminada cada una, finalmente en las delegaciones La Presa, y Centenario en no se encontró contaminación en ninguna de las 8 muestras.

En la tabla No. 5 y grafica No. 2, se observan las muestras contaminadas por microorganismos encontradas en cada delegación de la ciudad de Tijuana, la delegación Sánchez Taboada, el porcentaje representado es en proporción a las 17 muestras contaminadas en el análisis.

Tabla No. 5 Muestras contaminadas microbiológicamente por delegación

Delegación	Analizadas	Contaminadas	% de muestras contaminadas
La Mesa	8	1	5.9
Sánchez Taboada	8	1	5.9
Cerro colorado	8	3	17.6
Centro	8	1	5.9
Playas	8	3	17.6
San Antonio de los Buenos	8	4	23.5
Otay	8	4	23.5
Centenario	8	0	0
La Presa	8	0	0
Total	72	17	100



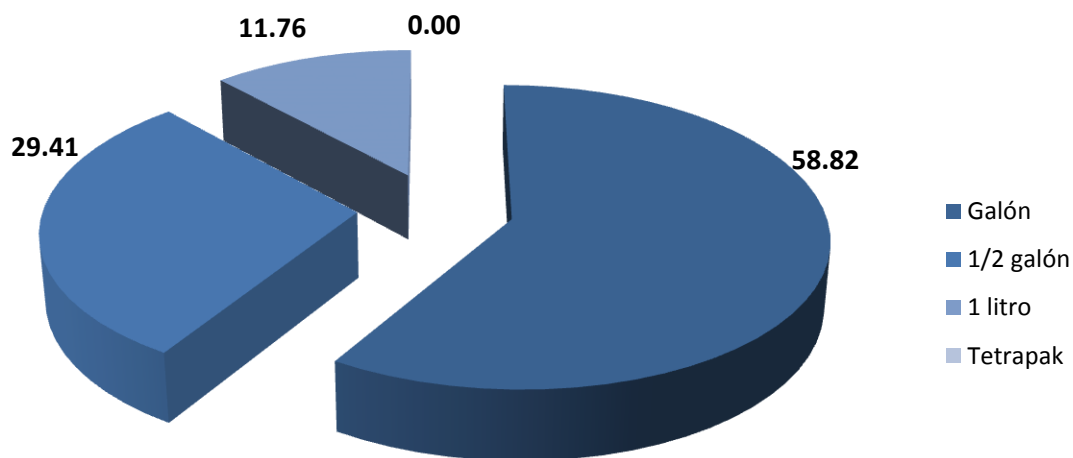
Gráfica No. 2. Porcentaje de muestras de leche contaminadas por delegación

En los resultados por tipo de envase, el que mostró mayor contaminación fue el de galón independientemente de la marca, de las 18 muestras analizadas con este envase 10 presentaron contaminación, esto representa el 14% del total de muestras, este tipo de envase es el que la población elige con mayor frecuencia, ya que su contenido de leche es mayor al de los otros envases y satisface las necesidades alimentarias de las familias de la ciudad, lo que representa un problema para la salud de las familias sobre todo en los niños que son los principales consumidores de este producto. En el análisis de leche en Tetrapak, en este estudio las muestras resultaron libres de bacterias contaminantes, resultado similar a lo reportado en Hassan et al. 2009, ellos analizaron 4 muestras de leche UHT durante 12 semanas en las cuales no se presentó crecimiento durante ese tiempo.

En la tabla No. 6 están representadas las muestras contaminadas por microorganismos detectadas por tipo de envase, se observa que la mayor contaminación se presenta en las muestras de leche que se compran en galón.

Tabla No. 6. Muestras contaminadas con microorganismos por tipo de envase

Tipo de envase	Analizadas	Contaminadas	%	% de contaminadas
Galón	18	10	14	59
Medio galón	18	5	7	29
Un litro	18	2	3	12
Tetrapak	18	0	0	0
Total	72	17	23.61	100



Gráfica No. 3. Muestras de leche contaminadas por tipo de envase

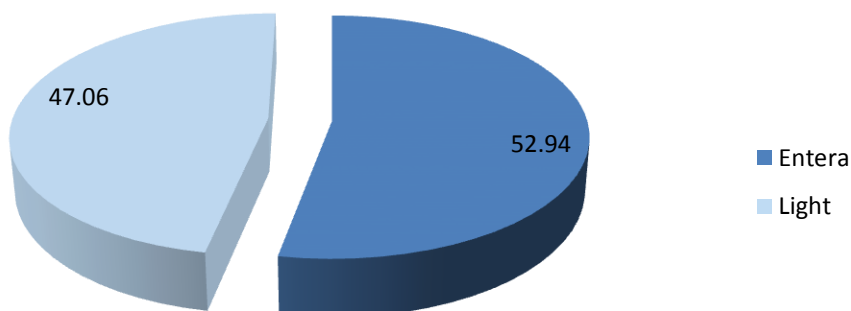
En la gráfica No. 3 se muestran los porcentajes de muestras contaminadas, de acuerdo al envase de presentación, no aparece el tipo de envase Tetrapak, ya que ninguna de las muestras analizadas en este tipo de envase, presentaron contaminación microbiana.

Se tomaron muestras de dos tipos de leche, leche entera y leche light, de las 36 muestras analizadas de leche entera 9 presentaron contaminación y de las 36 muestras analizadas de leche light 8 presentaron contaminación, indicando que la leche entera es la que presenta mayor contaminación.

La tabla No. 7 muestra los dos tipos de leche analizadas y cuántas muestras presentaron contaminación bacteriana de cada una de ellas. El porcentaje de muestras contaminada es con respecto a las 17 positivas, la gráfica No. 4 indica que el tipo de leche entera presento mayor porcentaje de contaminación bacteriana con respecto a la leche light.

Tabla No. 7. Muestras contaminadas microbiológicamente por tipo de leche

Tipo de Leche	Analizadas	Contaminadas	%	% de contaminadas
Entera	32	9	13	53
Light	32	8	11	47
Total	64	17	24	100



Gráfica No. 4. Tipo de leche con mayor contaminación

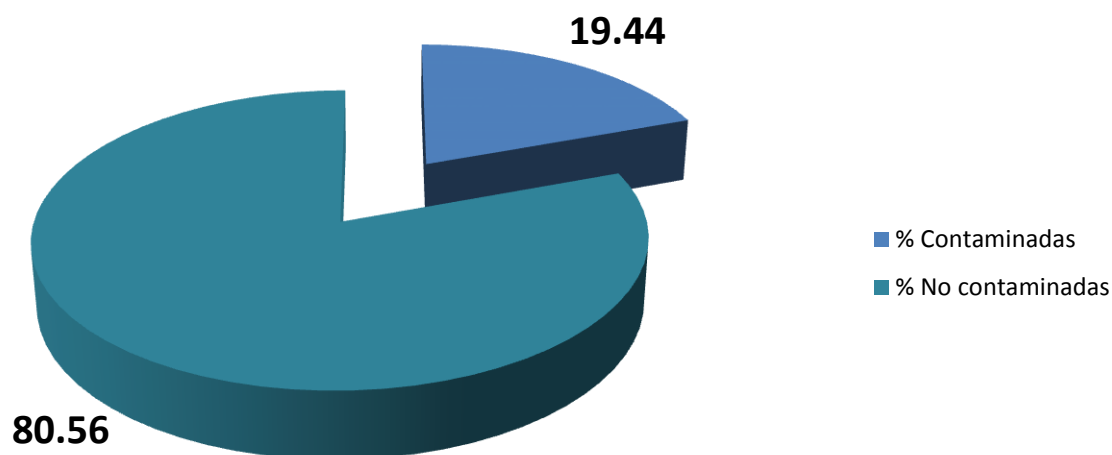
Las 72 muestras de leche fueron sometidas a análisis microbiológico para la búsqueda específica de Coliformes totales, *S. aureus*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*, de las 72 muestras analizadas, el 24% de ellas presentaron

contaminación bacteriana, de estas 7 (9.72%) resultaron fuera de especificación según los límites permitidos en la NOM-243-SSA1-2010, en el estudio de Luigi et al. 2013, los resultados obtenidos por ellos, marcan que de sus muestras contaminadas el 55% cumplió con las normas especificadas para Coliformes totales, mientras que en nuestro estudio el 94% de las muestras cumplen con las especificaciones para Coliformes totales.

La tabla No. 8 muestra el total de muestras con presencia de coliformes totales distribuidas por marca.

Tabla No. 8 Muestras contaminadas con Coliformes totales

Coliformes totales (<20Ufc/ml)					
	Analizadas	No contaminadas	% No contaminadas	Contaminadas	% Contaminadas
Marca 1	36	26	36.1	10	13.9
Marca 2	36	32	44.4	4	5.6
Total	72	58	80.6	14	19.4



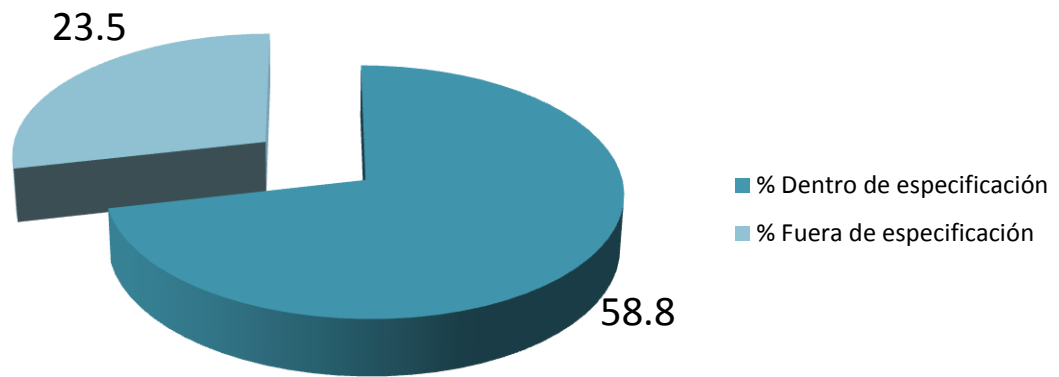
Gráfica No. 5. Presencia de Coliformes totales en leche

La grafica No.5 indica el porcentaje de muestras con la presencia de coliformes totales independientemente de la marca y tipo de leche muestreada.

La tabla No. 9 representa los porcentajes respecto a las muestras contaminadas con Coliformes totales las cuales rebasaron los límites permitidos por las Normas Oficiales Mexicanas.

Tabla No. 9. Muestras contaminadas con Coliformes totales dentro y fuera de especificación

Coliformes totales (<20Ufc/ml)						
	Analizadas	Contaminadas	Dentro de especificación	% Dentro de especificación	Fuera de especificación	% Fuera de especificación
Marca 1	36	10	7	41.2	3	17.6
Marca 2	36	4	3	17.6	1	5.8
Total	72	14	10	58.8	4	23.4



Gráfica No. 6. Muestras contaminadas dentro y fuera de especificación para Coliformes totales

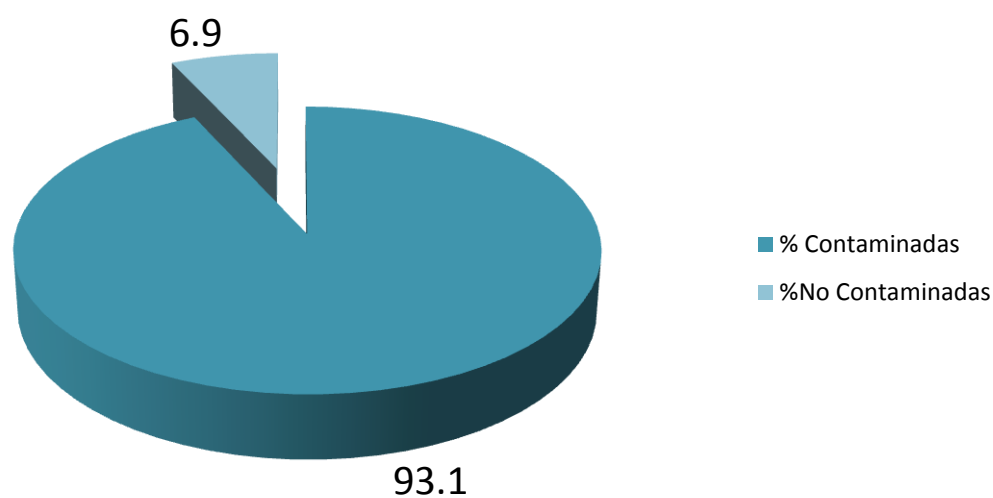
En la gráfica No. 6 se observa que de las muestras contaminadas con coliformes totales, el 23.5% de estas, están fuera de especificaciones según la NOM-243-SSA1-2010

En este estudio el 6.9% de las muestras presentaron contaminación por *Staphylococcus aureus*, en comparación con la bibliografía revisada, la mayoría de los autores no realizaron análisis para identificación de esta bacteria en muestras de leche pasteurizada, sin embargo es importante este análisis debido a que en nuestros resultados si se encontraron algunas muestras contaminadas con esta bacteria, lo que indica que la pasteurización no siempre es efectiva.

En la tabla No. 10 se muestra el total de muestras contaminadas con *Staphylococcus aureus* tanto dentro como fuera de límites permisibles.

Tabla No.10. Muestras contaminadas con *Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i> (<10Ufc/ml)					
	Analizadas	No contaminadas	%	Contaminadas	%
Marca 1	36	33	45.8	3	4.17
Marca 2	36	34	47.2	2	2.78
Total	72	67	93.1	5	6.94



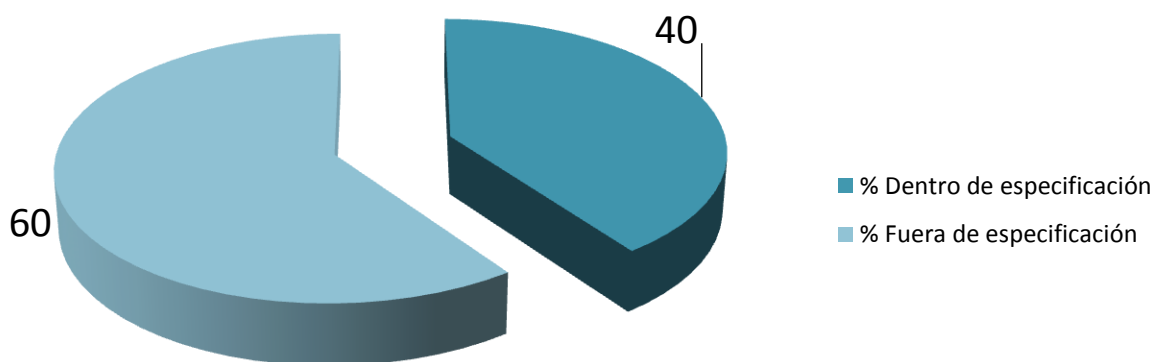
Gráfica No. 7. Presencia de *Staphylococcus aureus* en leche

En la gráfica No. 7 se muestra los resultados de los análisis de leche para la búsqueda de *Staphylococcus aureus*, donde se indica que el 6.9% de las muestras son positivas para este microorganismo.

En la tabla No. 11 se observa que las muestras contaminadas con *Staphylococcus aureus* se encuentran dentro y fuera de las especificaciones marcadas en las Normas Oficiales Mexicanas.

Tabla No. 11. Muestras dentro y fuera de especificación para *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i> (<10Ufc/ml)						
	Analizadas	Contaminadas	Dentro de especificación	% Dentro de especificación	Fuera de especificación	% Fuera de especificación
Marca 1	36	3	2	40.0	1	20.0
Marca 2	36	2	0	0	2	40.0
Total	72	5	2	40.0	3	60.0



Gráfica 8. Muestras contaminadas dentro y fuera de especificación para *Staphylococcus aureus*

En la gráfica No.8 se puede observar que de las muestras positivas para *Staphylococcus aureus* el 40% están fuera de especificación.

En el total de muestras analizadas durante el periodo de 5 meses, en ninguna muestra se detectó presencia de *Salmonella spp.*, los resultados concuerdan con los estudios realizados por Luigi et al. 2013, Agarwal et al. 2012, donde se buscó la presencia de esta bacteria, sin embargo no estuvo presente lo que demuestra que la pasteurización y el procesamiento de leche son efectivo para la eliminación de esta bacteria. De igual manera *Listeria monocytogenes* no se detectó en las 72 muestras analizadas, concordando que la pasteurización es efectiva en la eliminación de dicha bacteria.

Durante el muestreo, una de las variables importantes que había que controlar fue la temperatura de las muestras, esta debía estar entre 2 y 8°C, durante los días más calurosos del verano este resultó ser un problema, sin embargo, 4 muestras presentaron un incremento de temperatura al momento de analizarlas, superando la temperatura óptima se observó que a pesar de esto, las bacterias no presentaron cambios representativos en el conteo, el máximo de colonias detectadas fueron 10 ufc/ml para Coliformes totales lo cual está dentro del límite especificado por la NOM-243-SSA1-2010, en cuanto a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*, estos no se detectaron.

En la tabla No. 12 se observan las 4 muestras que salieron de especificación en cuanto a los límites de temperatura especificados en la Norma Oficial Mexicana, estas al momento de ser analizadas tuvieron una temperatura fuera de especificación, sin embargo ninguna de estas presentó microorganismos fuera de límite, lo que indica que esta temperatura de análisis no afectó los resultados obtenidos.

Tabla No. 12. Efecto de la temperatura en la presencia de microorganismos detectados en las muestras de leche

Marca	Envase	Temperatura fuera de rango (2-8°C)	Coliformes totales (<20Ufc/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i> (<10 Ufc/ml)	<i>Salmonella spp</i> (Ausencia)	<i>Listeria monocytogenes</i> (Ausencia)
Marca 1	Galón	9	6.7	3	0	Ausencia
Marca 1	Galón	10	6.7	1	0	Ausencia
Marca 1	1/2 galón	10	6.7	10	0	Ausencia
Marca 1	1 litro	11	6.7	2	0	Ausencia

LIMITACIONES

1. La aplicación del instrumento de medición para el consumo de leche.
2. La trazabilidad de las muestras de leche por lotes.
3. La obtención de las muestras.
4. La información de producción industrial mensual.

FORTALEZAS

1. La infraestructura del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, para el desarrollo de este tipo de estudios.
2. La cobertura del muestreo, se tiene la capacidad para muestrear en todas las delegaciones de la ciudad de Tijuana, B.C.
3. El método de análisis 3M Petrifilm, es una técnica eficiente y rápida para la detección y conteo de bacterias, los resultados se obtuvieron en menor tiempo que lo establecido por la NOM-243-SSA1-2010.

CONCLUSIONES

Se detectaron Coliformes fecales en el 19.44% de las muestras y *Staphylococcus aureus* en 6.94% .

Salmonella spp. y *Listeria monocytogenes* estuvieron ausentes en el 100% de las muestras.

La presencia de *Staphylococcus aureus* y Coliformes totales indica que la pasteurización no siempre es efectiva para eliminar estos microorganismos.

Se puede observar que la leche con mayor contaminación es la entera y en envase de galón, este es el envase predilecto para consumo en las familias tijuanaenses.

En las delegaciones de San Antonio de los Buenos y Otay fueron en las que se presentó mayor contaminación de la leche, en el análisis microbiológico presentaron mayor número de muestras contaminadas por Coliformes totales y *Staphylococcus aureus*.

En los días con temperaturas más altas durante el verano, las muestras que salieron de la temperatura óptima antes de analizarlas, no se vieron afectadas ya que no se detectó presencia de alto número de microorganismos, cabe mencionar que las muestras duraron fuera de esta temperatura un periodo máximo de 15 minutos.

La ausencia de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* en el total de muestras indica que la calidad de leche en Tijuana es muy buena, sin embargo para las muestras en donde se detectó la presencia de microorganismos patógenos que fueron Coliformes y *Staphylococcus aureus*, representa un problema local así como a nivel mundial, este al ser un alimento indispensable en el desarrollo de los niños, ellos están en mayor riesgo de adquirir enfermedades relacionadas con la presencia de estos microorganismos.

A pesar de las pocas muestras que presentaron algún microorganismo patógeno, se concluye que la leche pasteurizada de las principales marcas consumidas en la ciudad es de buena calidad.

RECOMENDACIONES

Se recomienda revisar por parte de las industrias los procesos de pasteurización y validación de los métodos microbiológicos después de la pasteurización para verificar la eliminación efectiva de bacterias patógenas.

Incorporar a la evaluación de la calidad microbiológica de la leche envasada, la búsqueda de *Staphylococcus aureus* ya que se comprobó que este es resistente a la pasteurización.

Es importante que los supermercados revisen la rotación de leche, para disminuir el problema de contaminación por rezago o estancamiento en el mercado.

En 2013, según datos de CANILEC en México se producen alrededor de 10,927 millones de litros de leche, representando \$61,406,110 millones de pesos, por lo que es importante la eliminación de bacterias patógenas así como de Coliformes totales, debido a que representan un problema de salud pública.

Se recomienda educar a los consumidores, para mantener la cadena de frío, así como la manipulación correcta de la leche.

REFERENCIAS

1. Análisis del sector lácteo en México. Dirección general de industrias básicas. Secretaría de Economía, 2012.
2. Arrieta LEM. Evaluación microbiológica de la leche y los productos lácteos producidos en cuatro expendios de la zona metropolitana de Morelia. Tesis, 2011.
3. Agarwal A, Awasthi V, Dua A, Ganguly S, Garg V, Marwaha S. Microbiological Profile of Milk: Impact of Household Practices. Indian Journal of Public Health. 2012; 56(1): 88-94.
4. Ayele W, Svastova P, Roubal P, Bartos M, Pavlik I. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. Applied and environmental microbiology. 2005; 71(3):1210-1214.
5. Badui SD, Química de los alimentos. 4ta edición. México, 2006.
6. Banco Mundial, 2011. Module 4- Smallholder dairy production. Agriculture Investment Sourcebook.
7. Bianchi V, Borella L, Benedetti V, Parisi A, Miccolupo A, Santoro E, Recordati C, y Luini M. Prevalence in bulk tank milk and epidemiology of Campylobacter jejuni in dairy herds in Northern Italy. Applied and environmental microbiology, 2014;80(6):1832-1837.
8. Boletín de leche. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA, 2013.

9. Burbano EM, Carrascal AK, Mercado M, Poutou RA. Validación de PCR para *Listeria monocytogenes* en Leches. Normas y calidad, 2003;57:39-48.
10. Calderón A, Rodríguez V, Arrieta G, Martínez N, Vergara O. Calidad fisicoquímica y microbiológica de leches crudas en empresas ganaderas del sistema doble propósito en montería (Córdoba). Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 2012;15(2):399-407.
11. Carrascal CAK, Albarracín CY, Sarmiento TP. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche de vaca expendida en el municipio de Pamplona, Colombia. Revista de la facultad de Ciencias Básicas, 2007;5(2):49-57.
12. Carrillo LB, González MM, Schobitz TR, Molina CLH, Brito CC. Niveles de contaminación microbiológica en equipos de recepción y almacenamiento de leche, en centros de acopio de la provincia de Valdivia. Agro Sur, 2004;32(2):45-53.
13. Celis M, Juárez D. Microbiología de la leche. Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional. Argentina, 2009.
14. Chatterjee SN, Bhattacharjee I, Chatterjee SK, Chandra G. Microbiological examination of milk in Tarakeswar, India with special reference to coliforms. African Journal of Biotechnology. 2006; 5(15):1383-1385.
15. Elizondo-Salazar JA, Jones CM, Heinrichs AJ. Evaluation of calf milk pasteurization systems on 6 Pennsylvania dairy farms. J. Dairy Sci. 2010;93:5509–5513.

16. Faye B, Konuspayeva G. The sustainability challenge to the dairy sector– The growing importance of non-cattle milk production worldwide. *International Dairy Journal*. 2012; 24(2):50-56.
17. Fromm H I, Boor K J, Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. *Journal of food science*. 2004;69(2).
18. Fundación para la Promoción y el Desarrollo de la Cadena Láctea Argentina, 2012. Mercado mundial de lácteos. Osvaldo Cappellini, Juan José Linari.
19. Garedew L, Berhanu A, Mengesha D, Tsegay G. Identification of gram-negative bacteria from critical control points of raw and pasteurized cow milk consumed at Gondar town and its suburbs, Ethiopia. *BMC Public health*. 2012;12:950-957.
20. Hassan A, Amjad I, Mahmood S. Microbiological and physicochemical analysis of different UGT milk available in a local market. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. 2009; 2(3):434-447.
21. Índice lácteo de Tetra Pak Internacional. Número 1, 2009.
22. Índice lácteo de Tetra Pak Internacional. Número 4, 2011.
23. Índice lácteo de Tetra Pak Internacional. Número 5, 2012.
24. Índice lácteo de Tetra Pak Internacional. Número 6, 2013.
25. Juste A, Thomma d BPHJ, Lievens B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*. 2008;25:745-761
26. Laboratorio Nacional de Protección al Consumidor. No todo lo que parece leche lo es: Leche, fórmulas lácteas y productos lácteos. *Revista del consumidor*. PROFECO, México, 2012.

27. Laguado J. Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. Revista MVZ Cordoba, 2007;12(2):1077-1095.
28. Leotta GA. Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos. Revista Argentina de Microbiología, 2009;41(2):63-64.
29. Luigi T, Rojas L, Valbuena O. Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada expendida en el estado Carabobo, Venezuela. Salus. 2013; 17(1): 35-50.
30. Magariños H. Producción higiénica de la leche cruda: Una guía para la pequeña y grande empresa. Producción y Servicios Incorporados S.A., México, 2001.
31. Manfredi EA, Leotta GA, Rivas M. PCR múltiple para la detección de los genes sea, seb, sec, sed y see de Staphylococcus aureus. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. Revista Argentina de Microbiología, 2010;42:212-215.
32. Miller BM, Sauer A y Moraru CI. Inactivation of Escherichia coli in milk and concentrated milk using pulsed-light treatment. Journal of Dairy science, 2012;95:5597-5603.
33. Moreno FCV, Rodríguez GM, Méndez VMM, Osuna LEA, Vargas MR. Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (departamento de Boyacá). Revista de Medicina Veterinaria. 2007; 14:61-83.

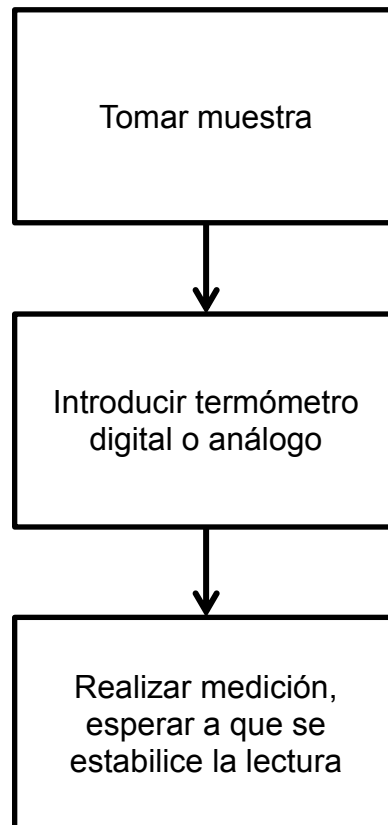
34. Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
35. O'Reilly C, O'Connor L, Anderson W, Harvey P, Grant I, Donaghy J, Rowe M, O'Mahony P. Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied and environmental microbiology*. 2008; 7(9): 5138-5144.
36. Pascual MRA. Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª edición. Madrid, 2000.
37. Revelli GR, Sbodio OA, Tercero EJ. Recuento de bacterias totales en leche cruda de tambos que caracterizan la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero. *Revista Argentina de Microbiología*. 2004;36:145-149.
38. Rodríguez MR, Suescún OG. Aplicaciones e inconvenientes de la técnica Hibridación in situ Fluorescente (FISH) en la identificación de microorganismos. *Salud Uninorte*. 2013; 29(2):327-340.
39. Shojaei ZA, Yadollahi A. Physicochemical and microbiological quality of raw, pasteurized and UHT milks in shops. *Asian Journal of Scientific Research*. 2008;1:532-538.
40. Signorini ML, Sequeira GJ, Bonazza JC, Santana RD, Santana RD, Martí LE, Frizzo LS, Rosmini MR. Utilización de microorganismos marcados para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de leche. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2008;XVIII (2):207-217.

41. Tremonte P, Tipaldi L, Succi M, Panella G, Falasca L, Capilongo V, Coppola R y Sorrentino E. Raw milk from vending machines: Effects of boiling, microwave treatment, and refrigeration on microbiological quality. *Journal of Dairy science*, 2014;97:3314-3320.
42. Valbuena E, Castro G, Lima K, Acosta W, Bríñez W, Tovar A. Calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizada distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2004; XIV(1):59-67.
43. Vázquez-Ojeda EG, Pérez-Morales ME, Hurtado-Ayala LA, Alcántara-Jurado LA. Evaluación de la calidad microbiológica de la leche: Revisión Sistemática de 2003 a 2013. *Revista Iberoamericana de ciencias*, 2014; 1(3):91-99.
44. Villareal CJ, Soto VZ, Pereira SAN, Varela PL, Jaramillo RL, Villanueva TD, Mendoza ET. Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Salmonella* sp. en leche en polvo: Optimización del método en 12 horas. *Salud Uninorte*, 2008;24(2):216-225.
45. Whitehead KA, Smith LA, Verran J. The detection of food soils and cells on stainless steel using industrial methods: UV illumination and ATP bioluminescence. *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 127:121-128.

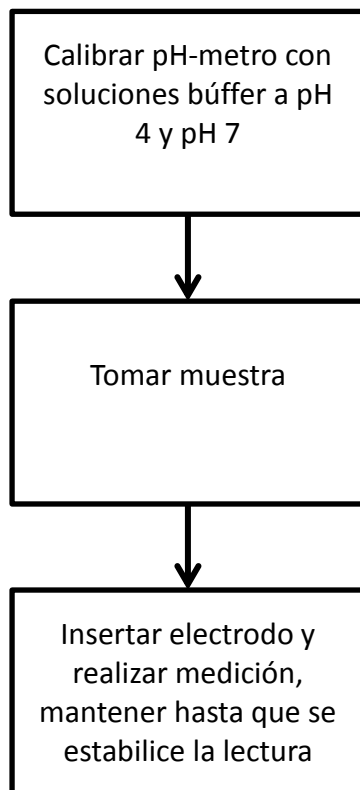
ANEXOS

ANEXO I Métodos físicos

Determinación de Temperatura



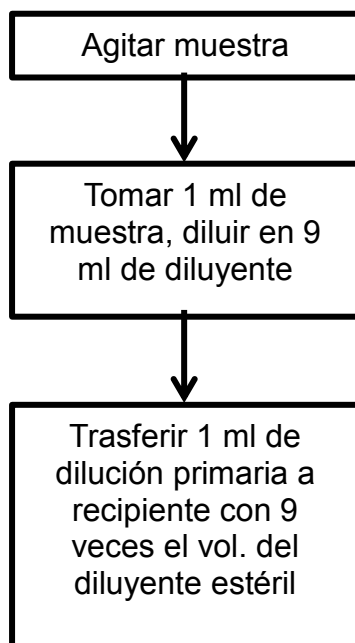
Determinación de pH



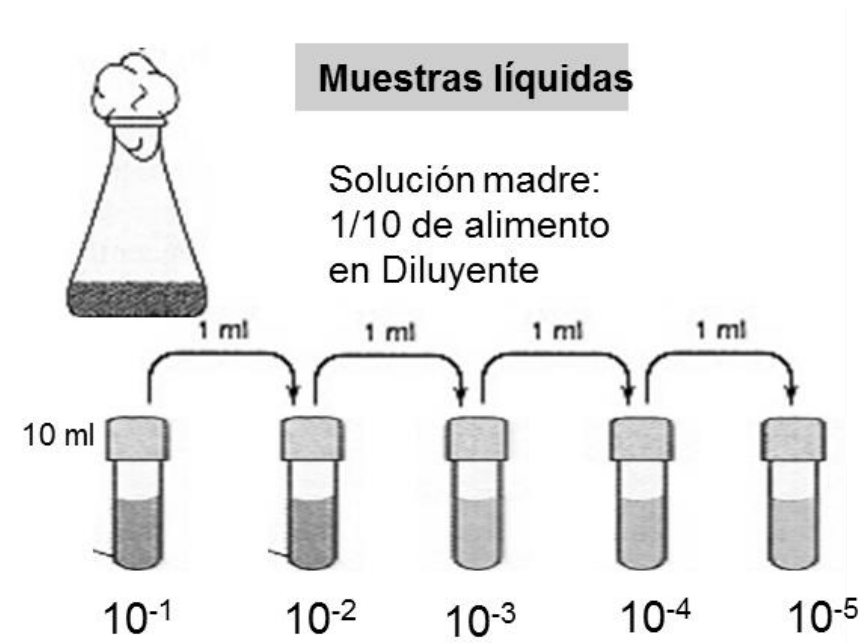
Nota: Se debe tener cuidado, si la leche tiene una película de grasa, será necesario limpiar el electrodo con un detergente para evitar que quede pegada.

ANEXO II Análisis microbiológicos

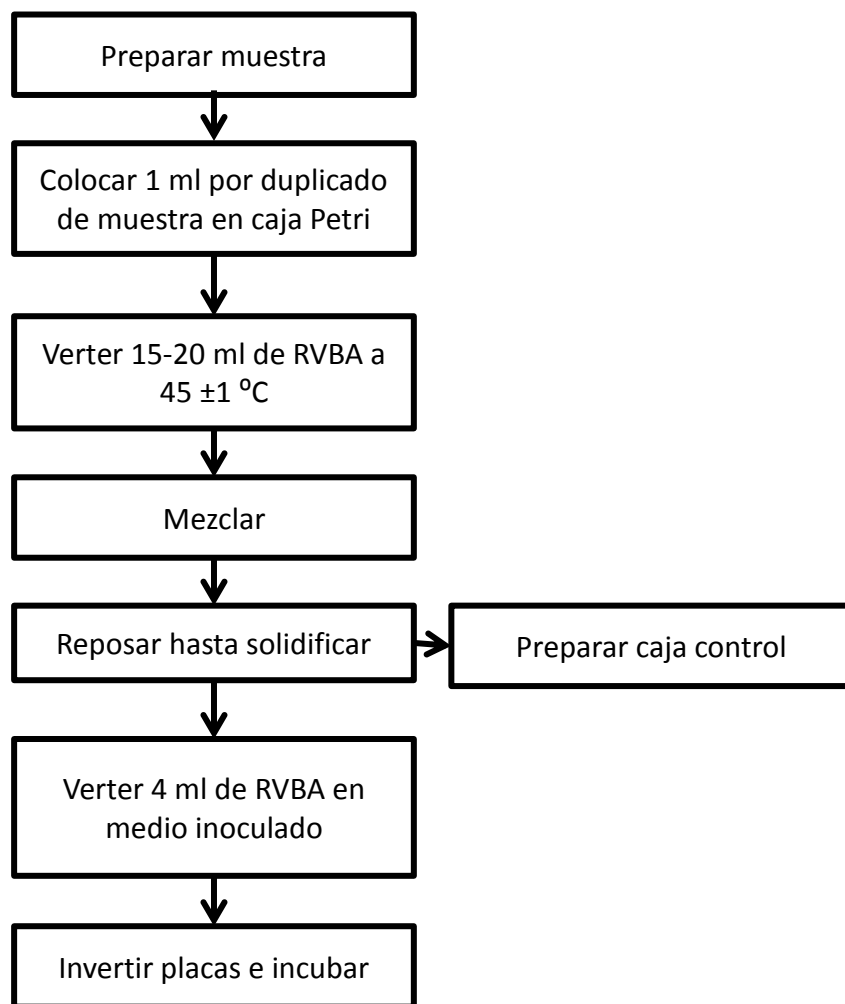
Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.



Ejemplo:



Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

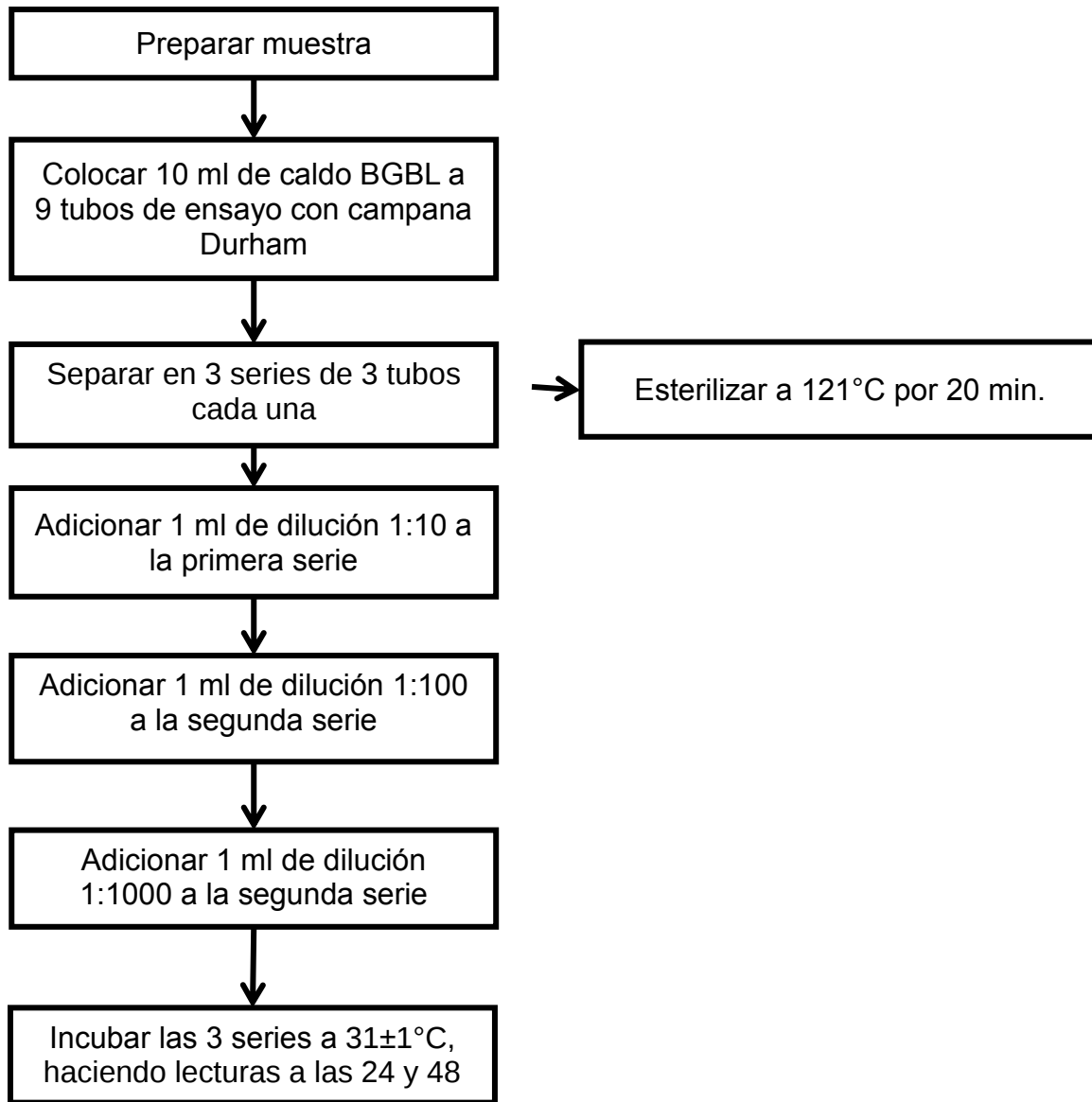


Colonias características: Color rojo oscuro, precipitación de sales biliares de color rosa a rojo con diámetro de 0.5-2 mm

Informe de prueba:

$\frac{UFC}{g \text{ o } ml}$ en placa agar rojo violeta bilis incubado a 35°C durante 24 ± 2 horas

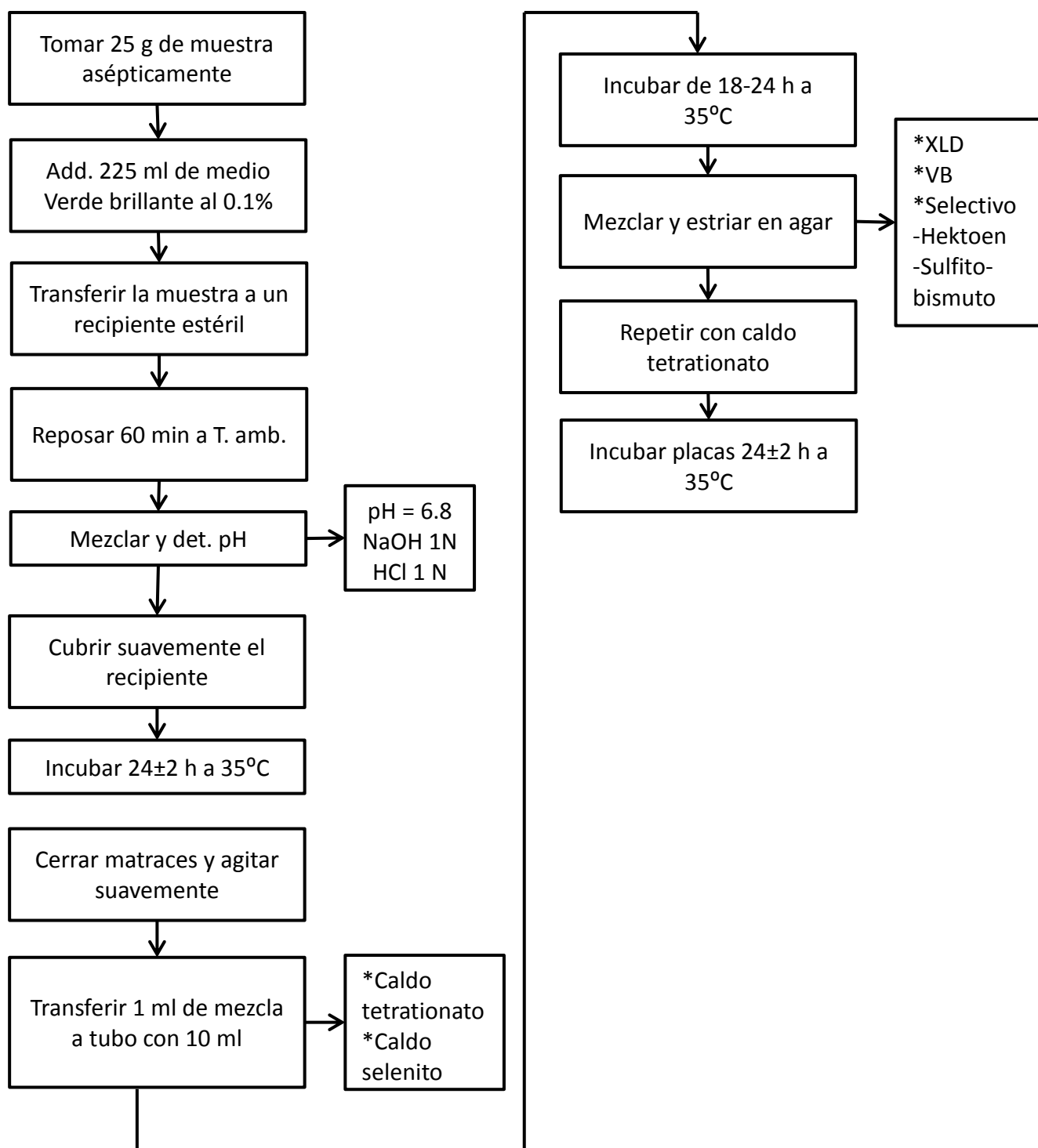
Recuento de enterobacteriaceae lactosa-positivas (coliformes)



Positivos: Formación de burbuja de gas en campana Durham

Informe: Con la tabla del Número más probable (NMP) reportar recuento en g/ml de muestra

Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.



Positivo:

Agar XLD: Colonias rojas o rosas, transparentes, con o sin centro negro, pueden aparecer completamente negras.

Agar VB: Colonias rojas o rosas, transparentes, rodeadas por medio enrojecido, bacterias fermentadoras de lactosa dan color amarillo.

Agar entérico Hektoen: Colonias verdes o azul-verdes con o sin centro negro.

Agar Sulfito de Bismuto: colonias cafés, grises o negras con o sin brillo metálico.

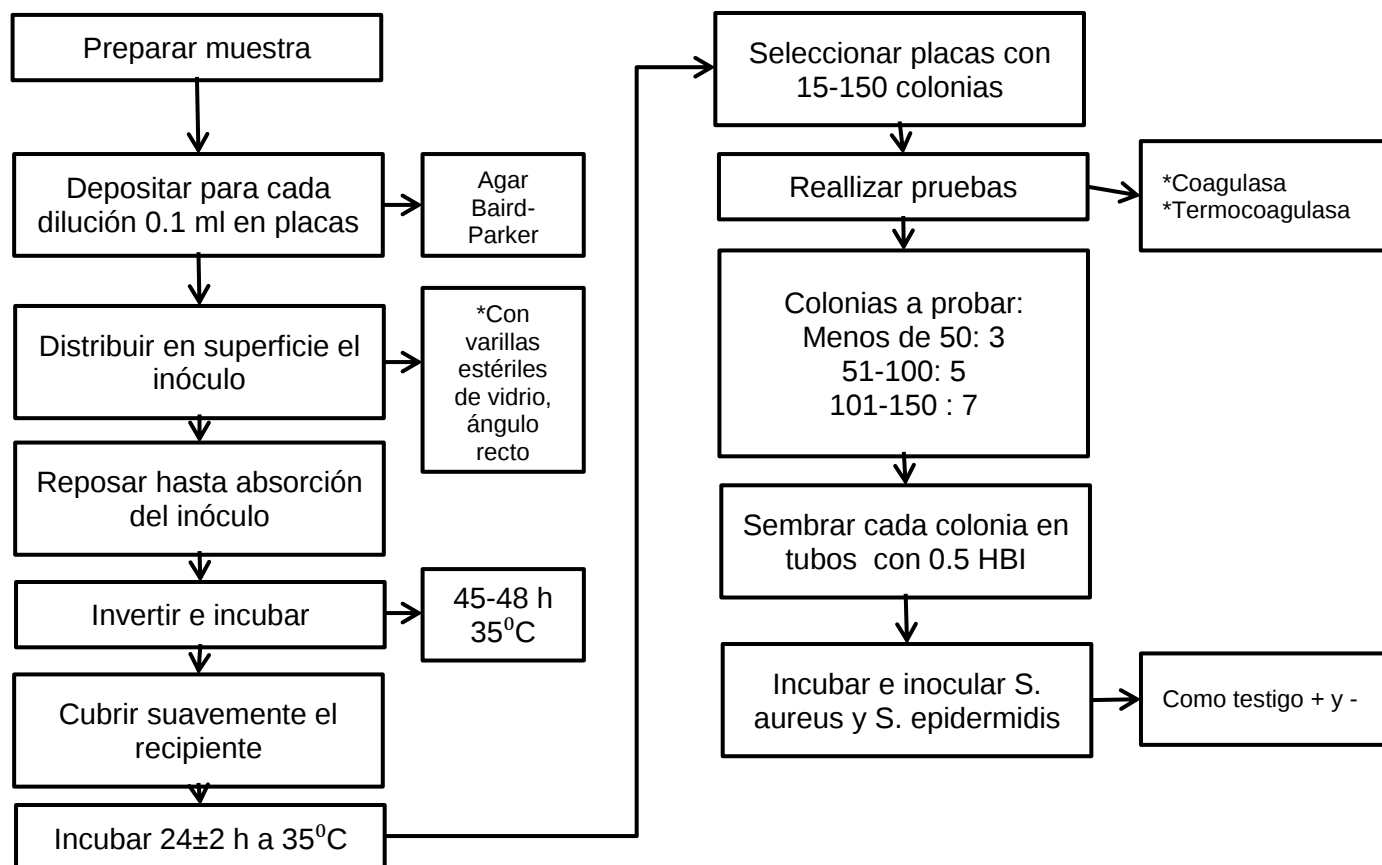
Agar SS: colonias traslúcidas, ocasionalmente opacas. Algunas tienen centro negro.

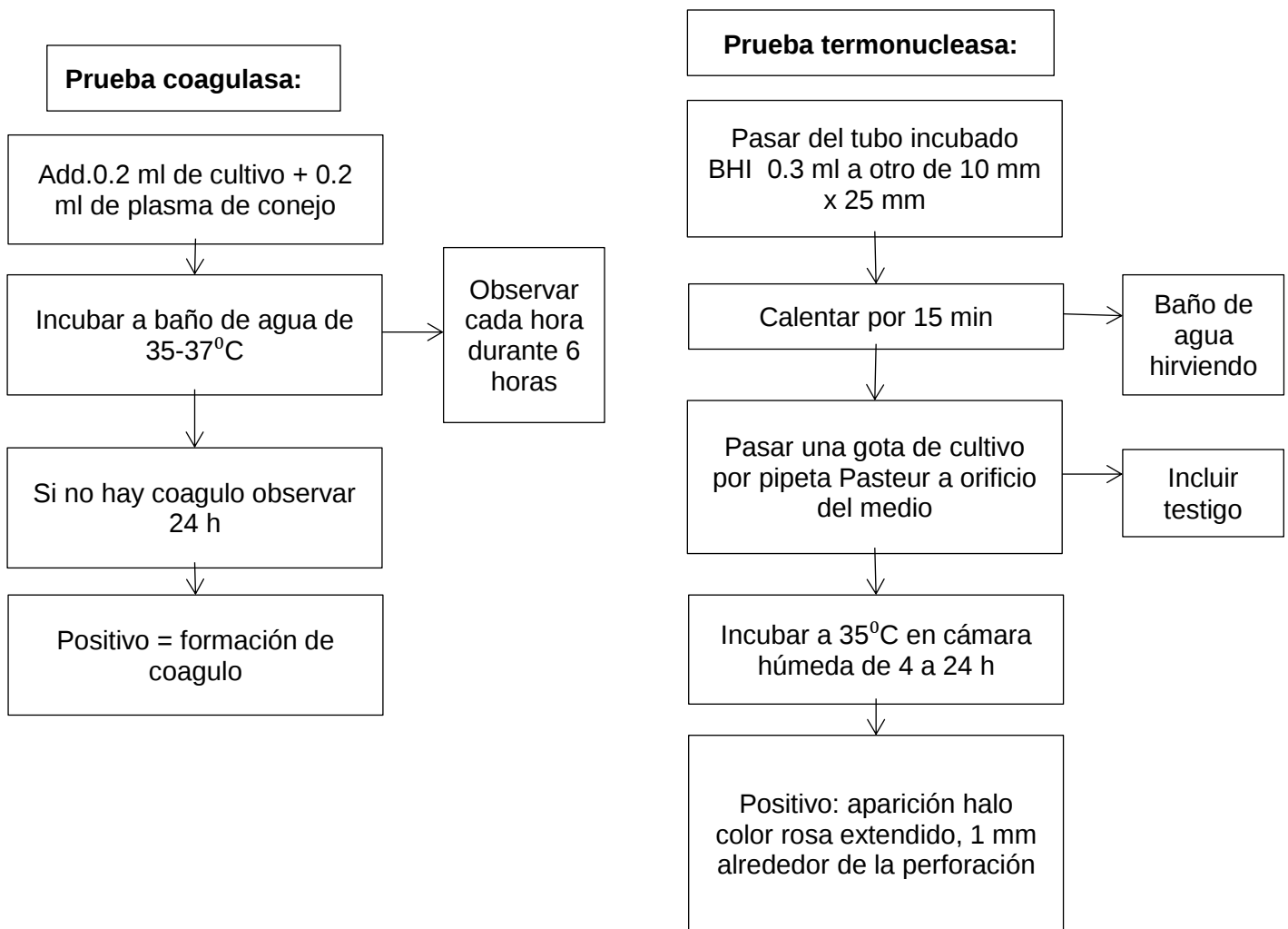
Las Fermentadoras de lactosa son rojas.

Informe:

Presencia o ausencia de *Salmonella* en ____ g o ml de muestra

Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.

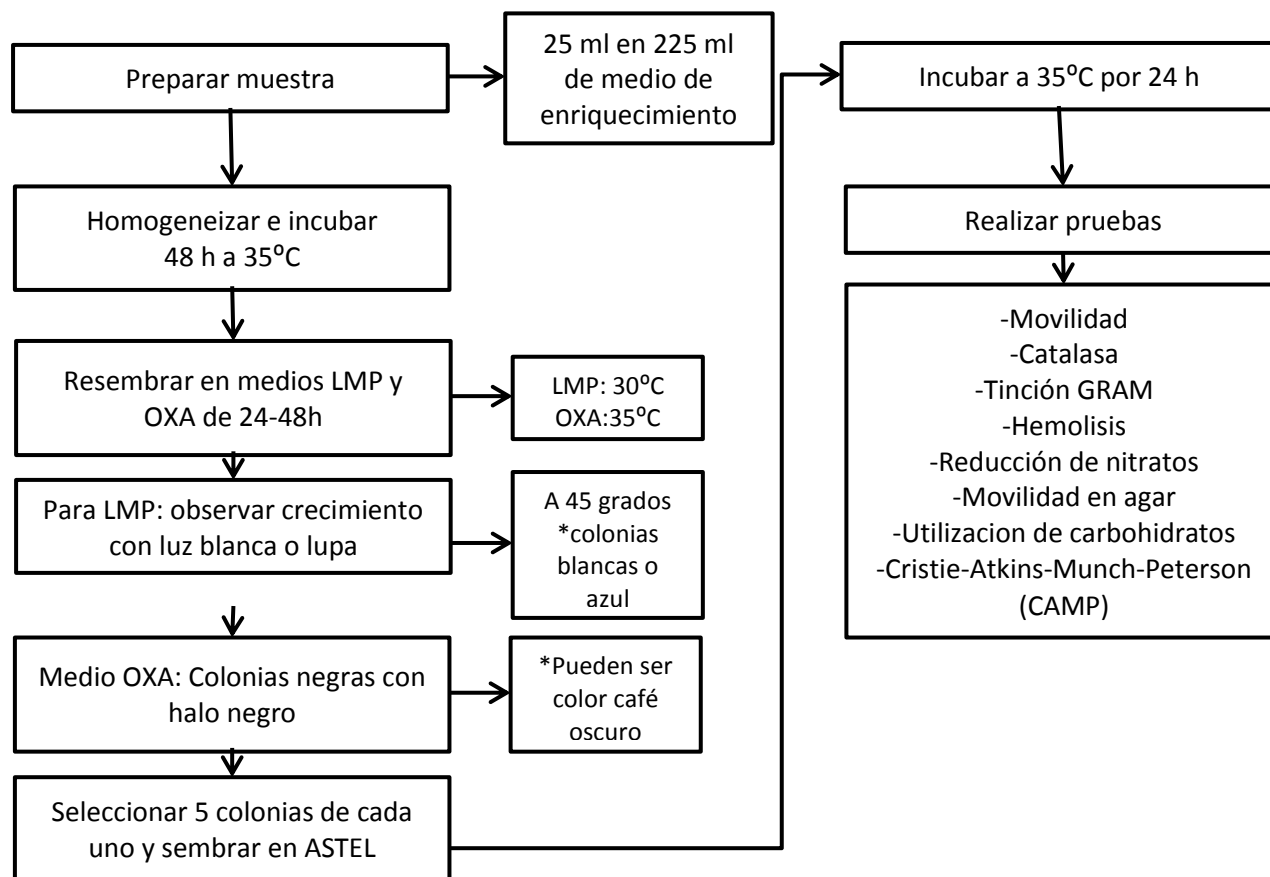




Resultados: Se cuentan las colonias de las placas positivas se multiplican por el factor de dilución de la placa correspondiente, este resultado se multiplica por 10 que es el factor de conversión

Informe: Recuento total de *S. aureus* por ml de muestra

Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.



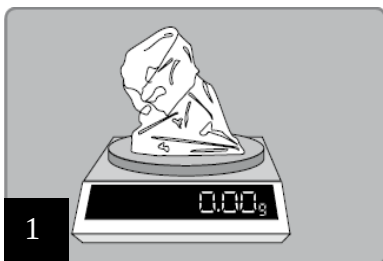
Resultados: En caso de dar positivas las pruebas anteriores, se verifica en el cuadro de diferenciación entre especies del género *Listeria*

La única especie del género *Listeria* de importancia para esta norma es *Listeria monocytogenes*.

Informe:

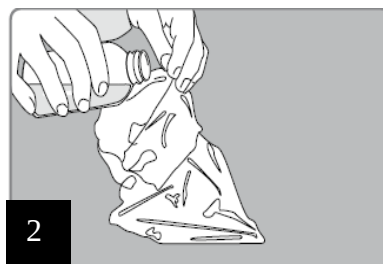
Cuando los resultados sean positivos para *L. monocytogenes* informar la presencia en 25 g o 25 ml de muestra. Y si los resultados son negativos informar ausencia en 25 g o 25 ml de muestra.

Preparación de muestras (método general)

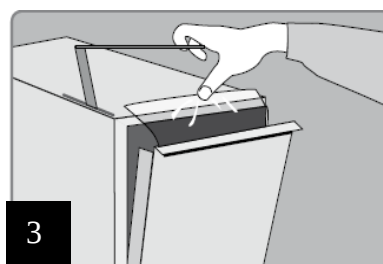


Pipetear/Pesar muestra en un recipiente estéril

(bolsa stomacher, botella de dilución, etc)

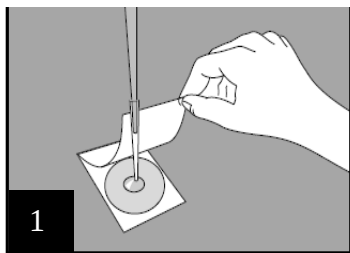


Adicionar el diluyente correspondiente a cada procedimiento

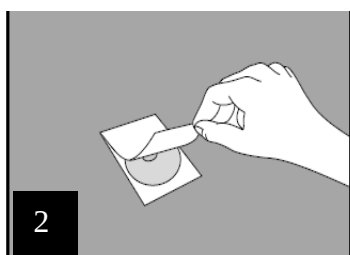


Mezclar/Homogeneizar muestra

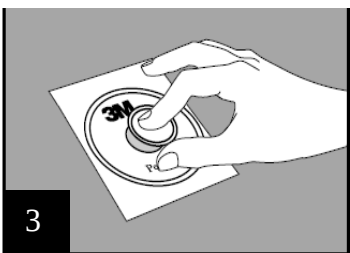
Placas Petrifilm 3M Staph Express para recuento de Staphylococcus aureus



Tomar 1 ml de muestra



Deslizar cuidadosamente la película superior hacia abajo para evitar burbujas. No dejar caer



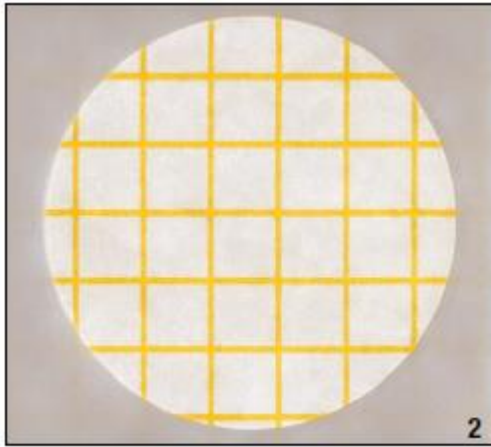
Aplicar suavemente presión al aplicador y distribuir el inóculo antes de que se forme el gel

Incubación:

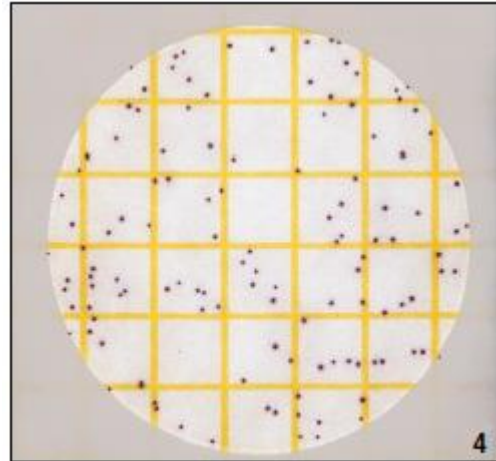
24±2 horas

35 °C ± 1 °C ó 37 °C ± 1 °C

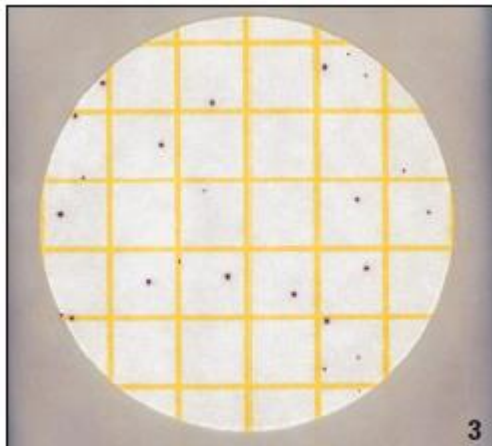
Resultados:



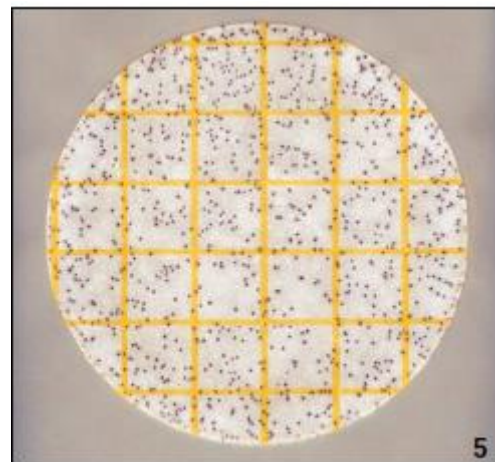
Recuento de *S. aureus* = 0



Recuento de *S. aureus* = 122



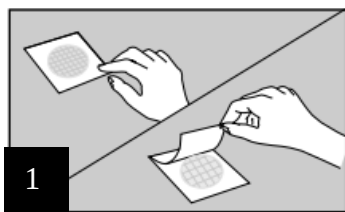
Recuento de *S. aureus* = 24



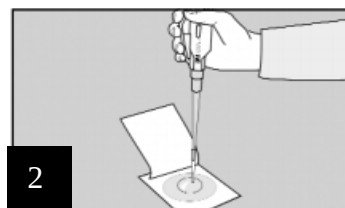
Recuento de *S. aureus* ≈ estimado 850

Positivo: Colonias rojo-violeta

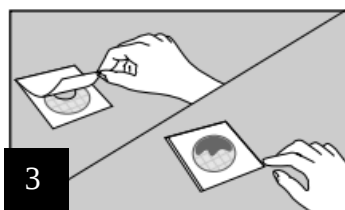
Placas Petrifilm 3M para detección de *Listeria* ambiental



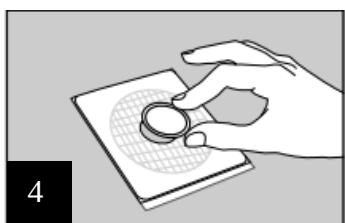
Colocar la placa 3M Petrifilm en superficie plana



Colocar con una pipeta 3 ml perpendicularmente en el centro de la placa



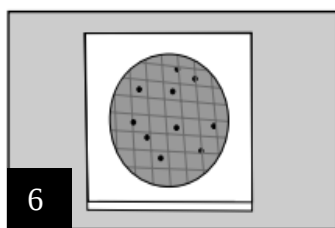
Deslizar la capa superior hacia la muestra



Presione suavemente con el esparcidor para distribuir la muestra

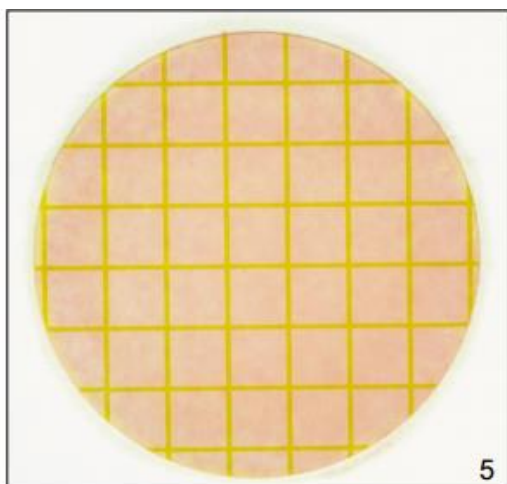


Incubar en grupos no mayores a 10, de 28 ± 2 h a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ o $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

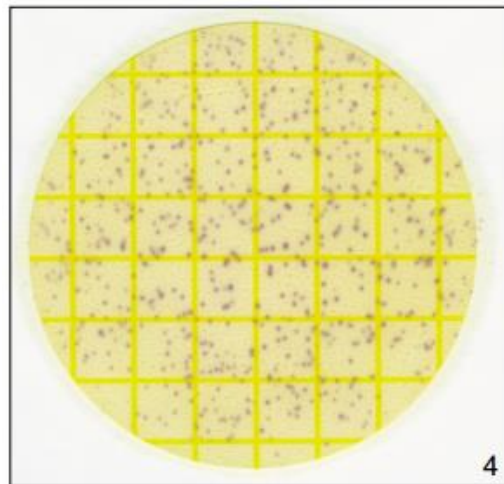


Para prueba cualitativa:
Detectada o no detectada
Presencia o ausencia de colonias rojo-violeta

Resultados:
Resultados:



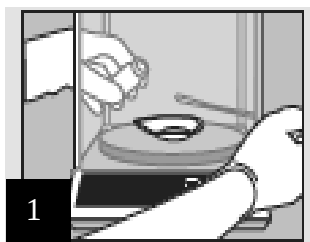
Ausencia



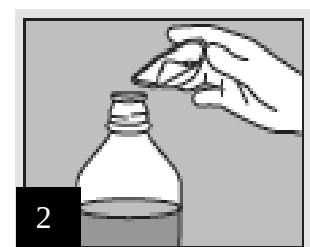
Presencia

Placas Petrifilm 3M *Salmonella* express

Procedimiento de enriquecimiento



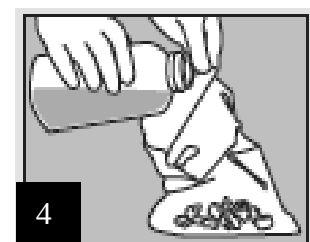
Pesar asépticamente la cantidad apropiada de 3M *Salmonella* Enrichement Supplement



Agregar asépticamente *Salmonella* Enrichement Supplement al ya esterilizado *Salmonella* Enrichement Base

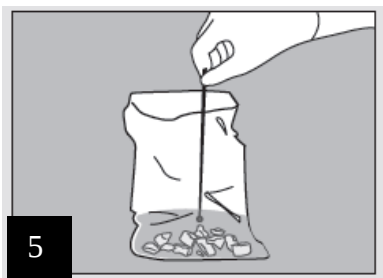


Pesar muestra

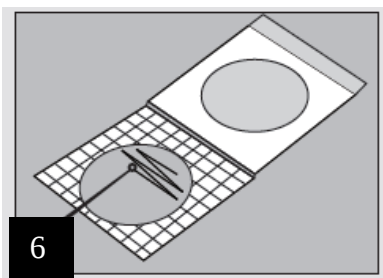


Agregar diluyentes a la muestra y homogenizar

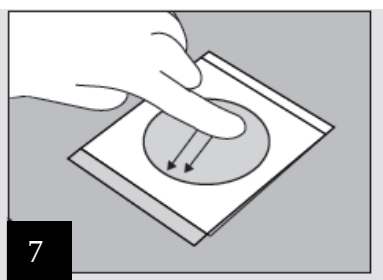
Inoculación (Para un esperado conteo bajo):



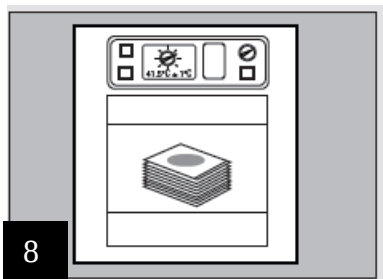
Tome una asada de 10µl (suave para evitar el rompimiento de la superficie del gel)



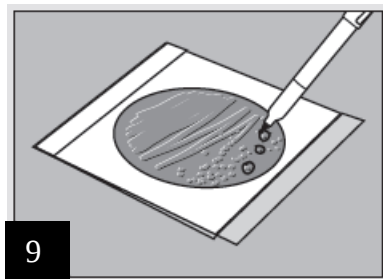
Haga la estría con un solo movimiento de arriba hacia abajo para obtener colonias aisladas.



Aplique un movimiento para evitar la formación de burbujas

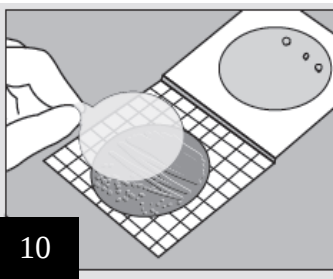


Inocule a $41.5^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ de 24 ± 2 horas. En grupos de no más de 20 placas.

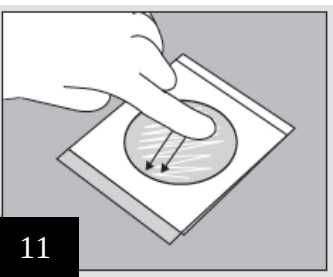


Marque con plumón las colonias presuntas positivas de Salmonella

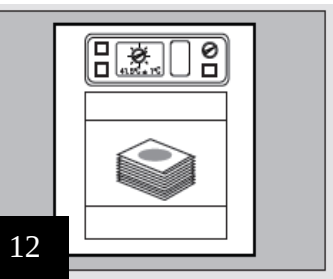
Confirmación bioquímica:



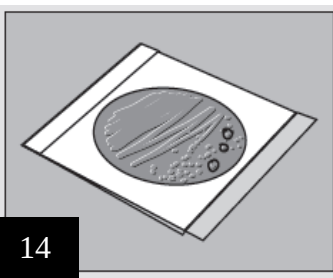
Inserte un disco de confirmación sobre el inóculo levantando la tapa del PetriFilm y ciérrelo



Usando guantes arrastre la tapa para evitar las burbujas o circulación de aire, asegure que haya buen contacto entre el gel y el disco de confirmación



Incube a $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 4-5 horas



Remueva de la incubadora y lea resultado solo de los círculos previamente marcados

Resultados:

Colonias en placa posibles positivas

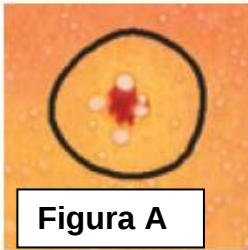


Figura A

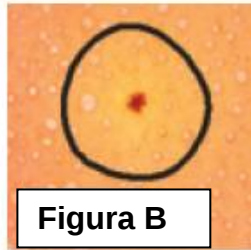


Figura B

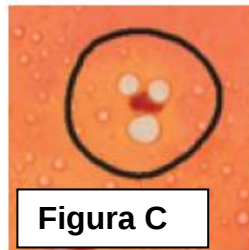


Figura C

Observación:

Figura A: Colonia roja con una zona amarilla asociada a producción de gas

Figura B: Colonia roja con una zona amarilla

Colonias de Salmonella confirmadas con disco de confirmación

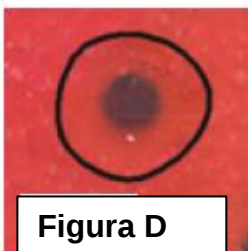


Figura D

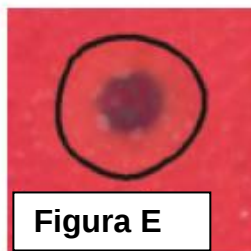


Figura E

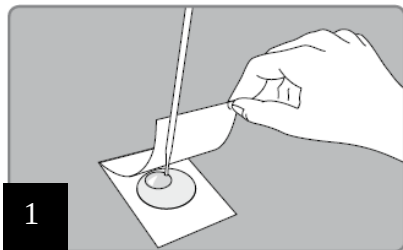
Observación:

Figura D: Colonias azul oscuro/negro con un precipitado azul.

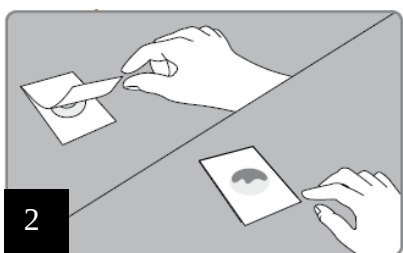
Figura E: Colonia azul oscuro/negro con un centro rojo oscuro y precipitado azul.

Placas Petrifilm para recuento de Coliformes totales

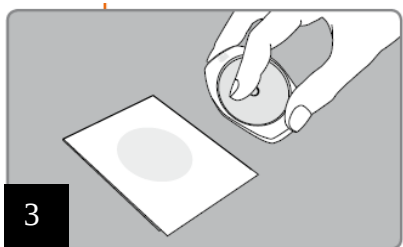
Nota: Después de la preparación de muestra ajustar pH entre 6.6 y 7.2 con HCL 1N o NaOH 1N



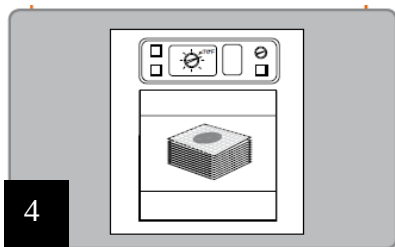
Con una pipeta en forma perpendicular colocar 1 ml de muestra en el centro del film inferior



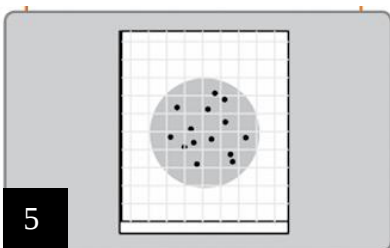
Bajar el film superior con cuidado evitando introducir burbujas de aire



Con el aplicador ejercer presión sobre el inóculo y esparcir
Esperar 1 min a que solidifique

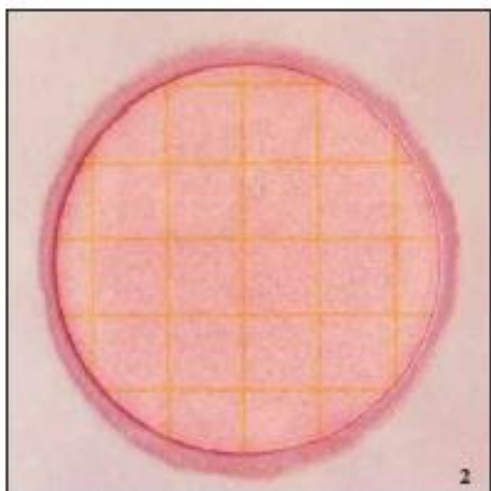


Incubar 24 ± 2 horas a $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

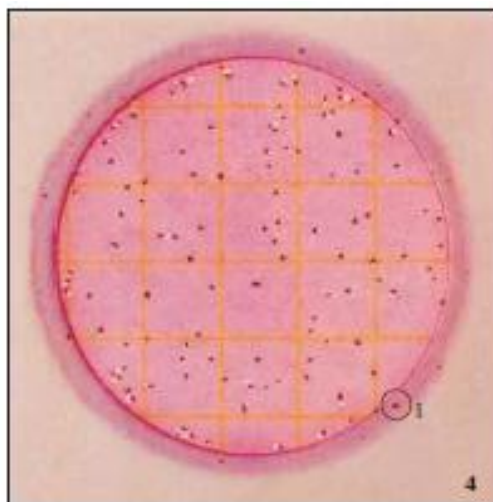


Consulte la guía de interpretación

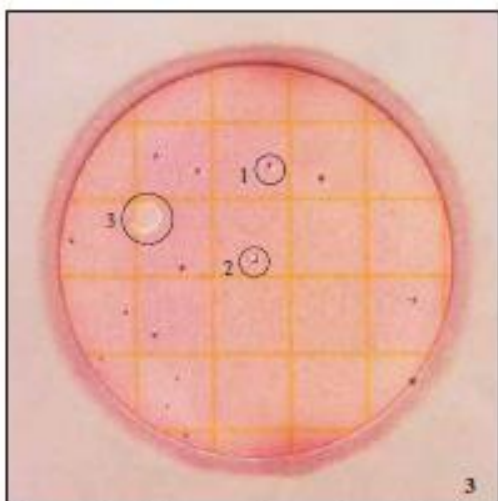
Resultados:



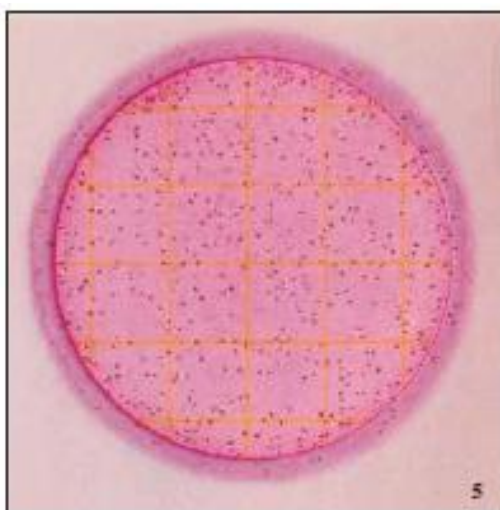
Recuento de colonias = 0



colonia. (ver Círculo 3).
 Recuento de colonias productoras de gas : 29
 Recuento de colonias no productoras de gas : 83
 Recuento total : 112



Recuento de colonias no productoras de gas : 7
 Recuento de colonias productoras de gas : 8
 Recuento total : 15



Recuento total estimado : 310