

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS

IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli* Y *Salmonella* spp EN LECHE CRUDA Y
SU RELACIÓN CON EL ENSILADO COMO FUENTE DE CONTAMINACIÓN
EN DIFERENTES REGIONES DE EL SALVADOR

PRESENTADO POR:

LICDA. DORIS YAMILETH ABREGO SORIANO
LICDA. ROONY ADVENIA SÁENZ DE CUÉLLAR

PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS

DICIEMBRE, 2024

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMÉRICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MAESTRA NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICENCIADA EUGENIA SORTO LEMUS

HOJA DE APROBACIÓN DE PROYECTO DE TESIS

Identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp en leche cruda y su relación con el ensilado como fuente de contaminación en diferentes regiones de El Salvador.

COMITÉ DE TESIS

PhD. Joaquín Miguel Castro Montoya

Docente Asesor

MSc. Ricardo Ernesto Gómez Orellana

Tribunal Evaluador

MSc. Wilber Samuel Escoto Umaña

Tribunal Evaluador

MSc. Jessica Tatiana Burgos Sierra

Coordinadora de Maestría

MSc. Edith Alicia Torres de Cantón

Coordinadora de Posgrado

Estudiantes

Licda. Doris Yamileth Abrego Soriano

MVZ. Rooney Advenia Sáenz de Cuéllar

Fecha de entrega: Diciembre de 2024

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de manera significativa a la realización de este trabajo de grado.

En primer lugar, agradecer asesor Dr. Joaquín Castro, por sus orientación, paciencia y apoyo constante a lo largo de este proceso. Sus conocimientos y consejos fueron fundamentales para dar forma a este trabajo y alcanzar los objetivos propuestos.

También quiero agradecer a nuestra coordinadora de la Maestría Licda. Tatiana Burgos, por sus sugerencias y comentarios, los cuales fueron extremadamente valiosos en la etapa de revisión y mejora del trabajo.

Agradecer a Enrique Cuellar, por el apoyo, motivación y acompañamiento en todas las etapas de este largo proceso.

Por último, pero no menos importante, dedico este trabajo a mis padres y familiares, quienes siempre creyeron en mí y me brindaron su apoyo incondicional a lo largo de este nuevo proyecto en mi carrera académica.

Gracias a todos los mencionados y a aquellos que de alguna manera contribuyeron a este logro. Este trabajo no habría sido posible sin ustedes.

Doris Abrego

Agradecimientos

A Dios gracias por haberme dado la oportunidad y la persistencia en este proyecto de investigación, sin Él no hubiera sido posible finalizarlo.

Agradezco a todas las personas que creyeron en mí, principalmente a mi familia ya que su apoyo ha sido fundamental para poderme proyectar en la vida.

Infinitas gracias al Dr. Joaquín, por ser mi mentor ejemplar, gracias por su paciencia, profesionalismo y apoyo incondicional en este trabajo.

Doris, gracias por tu paciencia y perseverancia para trabajar como un buen equipo.

A mi suegra, Esperanza Rodríguez, por animarme a finalizar este proyecto y en especial a mi esposo, Enrique Cuéllar, que compartió cada momento de mi frustración, alegría y agotamiento en cada una de las etapas de este proceso; gracias por el apoyo infinito.

Este reconocimiento es un recordatorio de que todo esfuerzo y trabajo duro valen la pena.

Advenia Sáenz

INDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS	11
Resumen	14
CAPÍTULO I	15
Introducción	16
CAPÍTULO II	18
Objetivos	19
<i>2.1 Objetivo General</i>	19
<i>2.2 Objetivos Específicos</i>	19
CAPÍTULO III	20
Marco teórico	21
<i>3.1 Enfermedades transmitidas por los alimentos</i>	21
<i>3.1.1 Contaminación de Escherichia coli en alimentos</i>	24
<i>3.1.2 Contaminación de Salmonella spp en alimentos</i>	25
<i>3.2 Inocuidad de los alimentos</i>	26
<i>3.3 La leche</i>	27
<i>3.3.1 Calidad higiénica de la leche</i>	29
<i>3.3.2 Calidad sanitaria de la leche</i>	30
<i>3.3.3. Calidad microbiológica de la leche</i>	30
<i>3.4 Buenas Prácticas de Ordeño</i>	32
<i>3.5 Ensilado</i>	33
CAPÍTULO IV	36

METODOLOGÍA	37
4.1 Metodología del estudio	37
4.1.1 Estudio prospectivo	37
4.1.2 Estudio experimental	37
4.2 Muestra	37
4.3 Análisis microbiológico	41
4.3.1 Determinación de <i>E. coli</i> en leche, por recuento en placa Petrifilm (Método 991.14 AOAC)	41
4.3.2 Determinación de <i>E. coli</i> en ensilado por recuento en placa Petrifilm (Método 991.14 AOAC)	43
4.3.3 Determinación de <i>E. coli</i> en superficies vivas e inertes (Método 991.14 AOAC)	46
4.3.4 Determinación de <i>Salmonella spp</i> en leche y ensilado (BAM, FDA Ch.5 Online)	48
4.3.5 Determinación de <i>Salmonella spp</i> en superficies vivas e inertes (BAM, FDA Ch.5 Online)	53
CAPÍTULO V	56
5.1 Presentación de resultados y discusión de resultados	57
5.2. Análisis estadístico de los resultados	61
5.2.1 Regresión lineal simple	61
5.2.2 Análisis de clusterización	63
5.2.3 Análisis de componentes principales	64
CAPÍTULO VI	69
Conclusiones	70
CAPÍTULO VII	71

Recomendaciones	72
REFERENCIAS	73
Referencias	74
GLOSARIO	78
Glosario	79
ANEXOS	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Página
Tabla 1 <i>Causas infecciosas de diarrea aguda</i>	22
Tabla 2 <i>Microorganismos en leche cruda</i>	29
Tabla 3 <i>Requisitos microbiológicos para clasificar la leche cruda según el Grado, de acuerdo con la Norma Salvadoreña Obligatoria para leche cruda de vaca</i>	31
Tabla 4 <i>Ganaderías seleccionadas para el estudio (ver anexo I)</i>	38
Tabla 5 <i>Crecimiento de E. coli en las diferentes muestras de las ganaderías de estudio</i>	57
Tabla 6 <i>Presencia de Salmonella spp en las diferentes muestras de las ganaderías de estudio</i>	60
Tabla 7 <i>Prácticas de ordeño identificadas en las ganaderías de estudio</i>	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Página
Figura 1 <i>Factores para lograr la inocuidad.</i>	27
Figura 2 <i>Lavado correcto de pezones previo al proceso de ordeño.</i>	32
Figura 3 <i>Materiales para la limpieza y desinfección de ubres durante el proceso de ordeño.</i>	33
Figura 4 <i>Clústers encontrados en el análisis</i>	63
Figura 5 <i>Relación entre las distintas variables estudiadas dentro de los componentes principales</i>	65
Figura 6 <i>Biplot de las variables estudiadas y las ganaderías monitoreada</i>	67

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
Anexo A Determinación de <i>Salmonella</i> spp en muestras de alimentos y superficie	75
Anexo B Determinación de <i>E. coli</i> por recuento en placa Petrifilm	76
Anexo C Ficha de toma de muestra de cada ganadería	77
Anexo D Ficha para toma de muestra de leche	78
Anexo E Ficha para toma de muestra de ensilado	79
Anexo F Ficha para toma de muestra de hisopado en superficie viva	80
Anexo G Ficha para toma de muestra de hisopado en superficie inerte	81
Anexo H Ficha técnica de hisopos PUR-blue	82
Anexo I Ubicación geográfica de El Salvador	85
Anexo J Análisis de componentes principales por ganadería	86
Anexo K Contribución de las variables en la dimensión 1 del análisis de componentes principales	87
Anexo L Contribución de las variables en la dimensión 2 del análisis de componentes principales	88
Anexo M Resultados de ganadería 1, región paracentral	89
Anexo N Resultados de ganadería 2, región paracentral	90
Anexo O Resultados de ganadería 3, región paracentral	91
Anexo P Resultados de ganadería 4, región central	92
Anexo Q Resultados de ganadería 5, región central	93
Anexo R Resultados de ganadería 6, región central	94
Anexo S Resultados de ganadería 7, región occidental	95
Anexo T Resultados de ganadería 8, región occidental	96
Anexo U Resultados de ganadería 9, región occidental	97

ABREVIATURAS

BPO	Buenas Prácticas de Ordeño
CDC	Center for Disease Control and Prevention
ETA	Enfermedades Transmisibles de los Alimentos
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Gramos
mL	Mililitros
NSO	Norma Salvadoreña Obligatoria
OIRSA	Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria
OMS	Organismo Mundial de la Salud
OMSA	Organismo Mundial de la Salud Animal
OPS	Organización Panamericana de la Salud
pH	Potencial de iones de hidrógeno
RMA	Recuento de Mesófilos Aerobios
RTCA	Reglamento Técnico Centroamericano

RTS	Reglamento Técnico Salvadoreño
spp	Especie
UFC	Unidad Formadora de Colonias
USAID	United States Agency International Development
VDLUFA	Verbands Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs und Forsschungsanstalten
°C	Grados Celsius
%	Porcentaje

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar *Escherichia coli* y *Salmonella* spp en leche cruda y su relación con el ensilado como fuente de contaminación en diferentes regiones de El Salvador; además de estudiar otras fuentes de contaminación, como la ubre y superficies involucradas en la recolecta de la leche en las ganaderías, las regiones de estudio fueron la región occidental, central y paracentral.

Se visitaron las ganaderías seleccionadas, donde se tomaron muestras de ensilado utilizando la técnica en W, para obtener una muestra homogénea y representativa de 500 gramos, para la determinación de *E. coli* y *Salmonella* spp. Para leche cruda de vaca, se tomaron 200 mL de muestra y para las muestras de ubres y superficie, se realizaron a través de hisopado, todas las muestras se trasladaron al Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Ministerio de Agricultura y Ganadería.

Los resultados obtenidos reflejaron que se identificó *E. coli* en ensilado, leche cruda, ubre y superficie. En cuanto a la detección de *Salmonella* spp en ninguna muestra hubo crecimiento. Se utilizó el programa R (versión 4.2.1) para presentación y análisis de los datos, se realizó regresión lineal y multivariada, análisis de clúster y componentes principales. Se concluye que no existe relación directa entre la calidad de la leche de vaca y el ensilado como fuente de contaminación, aunque se identifican malas condiciones higiénicas en las ganaderías, así como falta de implementación de buenas prácticas de ordeño.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

Introducción

Se han realizado una diversidad de estudios en torno a la calidad microbiológica de la leche cruda de vaca, para clasificarla según las categorías Grado A, Grado B y Grado C, también existen estudios que reflejan que la leche cruda es causante de enfermedades transmitidas por alimentos y que dentro de los agentes causales se encuentra *Escherichia coli* y *Salmonella* spp (Centros para el control y la prevención de enfermedades [CDC], 2022), por tal motivo la necesidad de cocción o pasteurización antes de consumir este producto. Pueden existir diversas fuentes de contaminación de la leche, principalmente aquellos materiales que están en contacto con la ubre de la vaca: alimentos y heces; así como factores externos que puedan contaminar la leche al momento de su producción, como puede ser la higiene de las ubres del hato lechero y las condiciones higiénicas de los recipientes que se utilizan para recolectar la leche.

El ensilado es uno de los principales alimentos empleados en la ganadería bovina, es un material vegetal que, debido a su proceso de fermentación, crea condiciones propicias para el crecimiento de microorganismos, algunos de los cuales pueden ser patógenos. En lo que respecta a la leche, esta puede contaminarse por microorganismos antes, durante y después del ordeño, a través de bacterias que se adhieren a la piel de la ubre y acceden al esfínter del pezón, así como por microorganismos que ingresan a través del sistema digestivo o la sangre. Además, las condiciones inadecuadas de las áreas destinadas al ordeño, junto con una limpieza deficiente del equipo y del personal, son factores adicionales que contribuyen a la contaminación.

Lo anterior, motivó a realizar la identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp en leche cruda y su relación con el ensilado como fuente de contaminación en diferentes regiones de El Salvador; y determinar las posibles

fuentes de contaminación de la leche, tomando en cuenta factores externos que pueden alterar la calidad de la leche.

Se realizó el muestreo en las regiones occidental, central y paracentral del país, en cada región se identificaron tres ganaderías en las cuales se tomaron muestras de ensilado y leche; así como muestra de hisopado de ubre y de superficie de los contenedores que recolectan la leche. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Ministerio de Agricultura y Ganadería; para el realizar el recuento de *Escherichia coli* y la determinación de la presencia/ausencia de *Salmonella* spp.

Con los resultados obtenidos se elaboraron tablas y gráficos de dispersión lineal, para realizar la discusión y análisis de los mismos por ganadería, por zona geográfica y cruzar variables para determinar una relación directa o indirecta en la calidad de la leche. Se logró determinar que la calidad microbiológica del ensilado no tiene una relación directa con la calidad de la leche producida; pero sí existe una relación directa entre la calidad de la leche y las condiciones higiénicas de la ubre y los recipientes que se utilizan para colectar la leche; por lo anterior, los factores externos son fuentes de contaminación de la misma.

CAPÍTULO II
OBJETIVOS

Objetivos

2.1 Objetivo General

Identificar *Escherichia coli* y *Salmonella* spp en leche cruda y su relación con el ensilado como fuente de contaminación en diferentes regiones de El Salvador.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Determinar recuento de *Escherichia coli* y presencia de *Salmonella* spp en la leche cruda y el ensilado.

2.2.2 Realizar hisopado de superficies vivas e inertes para descartar fuentes de contaminación de la leche con *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

2.2.3 Encontrar la relación entre la calidad microbiológica de la leche, el ensilado y la zona geográfica en que se ubica la ganadería.

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

Marco teórico

3.1 Enfermedades transmitidas por los alimentos

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS):

las “Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) pueden clasificarse en infecciones, intoxicaciones o infecciones por toxina. La infección transmitida por alimentos es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos conteniendo microorganismos patógenos vivos, como *Salmonella*, *Shigella*, el virus de la hepatitis A, *Trichinella spirallis* y otros” (OPS & OMS, s.f.):

Es importante tener en cuenta lo planteado anteriormente, en relación con la presencia de toxinas y microorganismos patógenos en los alimentos, los cuales son los causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, algunas de estas toxinas son originadas por algunos microorganismos, según el planteamiento siguiente:

La presencia de toxinas en los alimentos, originadas por ciertos microorganismos como bacterias y hongos, o por sustancias químicas en concentraciones dañinas, puede provocar intoxicaciones en quienes los consumen. Estas toxinas representan un riesgo para la salud, ya que no poseen características perceptibles como olor o sabor, lo que dificulta su detección. Además, su capacidad de causar enfermedades persiste incluso después de la eliminación de los microorganismos que las produjeron (OPS/OMS, s.f.).

Entre algunas de las infecciones transmitidas por alimentos se encuentran las diarreas agudas, las cuales pueden ser virales o bacterianas, los microorganismos responsables se pueden identificar en la Tabla 1.

Tabla 1*Causas infecciosas de diarrea aguda*

Diarrea Viral	Diarrea Bacteriana
<i>Rotavirus</i> Grupo A	<i>Salmonella</i>
<i>Adenovirus</i> entérico	<i>S. typhi</i>
	<i>S. paratyphi</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Salmonella</i> no tifoidea
<i>Calicivirus</i> humanos	<i>S. enteritidis</i>
<i>Norovirus</i>	<i>S. typhimurium</i>
<i>Sapovirus</i>	<i>Shigella</i>
	<i>Shigella sonnei</i>
	<i>Campylobacter</i>
Diarrea Parasitaria	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>E. coli</i> enteropatógeno
	<i>E. coli</i> enterotoxigénico
	<i>E. coli</i> entroinvasivo
	<i>E. coli</i> enterohemorrágico
	<i>E. coli</i> enteroadherente
	<i>E. coli</i> enteroagregante
	<i>Aeromonas</i>

Nota. Adaptado de *Síndrome diarreico, causas infecciosas de diarrea aguda*, Constanza Herrera T., 2019.

Una realidad de la sociedad salvadoreña es la comercialización de alimentos con poca inocuidad en establecimientos informales, además de poca vigilancia y control por las autoridades, las cuales suelen ser una causa del consumo de alimento contaminado y esto lo podemos confirmar con el estudio realizado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO (2009):

Los alimentos elaborados a nivel popular o en forma artesanal son considerados de obtención rápida y de bajo costo y eventualmente son una solución por parte de la población que enfrenta problemas de carácter socioeconómico. Esto obliga a que las personas que laboran en los centros urbanos y sus alrededores tengan que recurrir a los alimentos que se venden en pequeños comedores, en los mercados o en la vía pública. (p. 67)

De acuerdo con los aspectos antes descritos, existe el riesgo de que se desarrolle un brote alimentario, según *Jiménez et al. (2022)*:

Un brote de enfermedad transmitida por los alimentos se define como la incidencia observada, en determinadas circunstancias, de dos o más casos de la misma enfermedad o infección en seres humanos, o una situación en la que el número de casos observados supera el número esperado y en la que los casos tienen su origen probable en la misma fuente alimentaria. (p. 5)

Muchas de las infecciones suelen ocurrir por el consumo de alimentos crudos o poco cocidos. En 2020, el 59% de los brotes de salmonelosis fueron causados por el consumo de huevos y derivados. De acuerdo a *Jiménez et al. (2022)* los principales alimentos afectados fueron:

- Productos crudos o insuficientemente cocinados, derivados de: carne de aves, huevos, carne de cerdo o vacuno

- Leche cruda y productos lácteos con leche cruda
- Vegetales, zumos, cereales y semillas germinadas
- Productos de bollería y repostería
- Alimentos desecados o en polvo.

Para que ocurra una ETA, el patógeno o su toxina debe estar presente en el alimento. Sin embargo, la sola presencia del patógeno no significa que la enfermedad ocurrirá. En la mayoría de los casos de ETA:

- El patógeno debe estar presente en cantidad suficiente como para causar una infección o para producir toxinas
- El alimento debe ser capaz de sustentar el crecimiento de los patógenos, o sea, debe presentar características intrínsecas que favorezcan el desarrollo del agente (OPS/OMS, s.f.).
- El alimento debe permanecer en la zona de peligro de temperatura durante tiempo suficiente como para que el organismo patógeno se multiplique y/o produzca toxina. Otras condiciones extrínsecas deben prevalecer para que esta multiplicación y/o producción de toxina sea favorecida
- Debe ingerirse una cantidad (porción) suficiente del alimento conteniendo el agente, para que la barrera de susceptibilidad del individuo sea sobrepasada (Ministerio de Salud de El Salvador, 2018).

3.1.1 Contaminación de *Escherichia coli* en alimentos

Los alimentos suelen contaminarse con facilidad y una de las bacterias identificadas como indicador de contaminación se encuentra:

Escherichia coli es una bacteria que se encuentra en el sistema digestivo de los animales y de los seres humanos, y al ser parte de la flora intestinal se puede utilizar como indicador favorito para detectar y medir

la contaminación fecal en la evaluación de la seguridad de los alimentos y el agua (*Anderson et al., 2005, p. 3041*).

Por lo general, *E. coli* son comensales inofensivas, que constituyen el 1% de la población microbiana del tracto gastrointestinal; pero algunas *E. coli* son patógenas y pueden contaminar los alimentos, el agua y el medioambiente (*Kaper et al. 2004*).

La FAO (2011) en su publicación Prevención de *E. coli* en los alimentos, describe epidemiología de *E. coli* de la siguiente manera:

La epidemiología de *E. coli* patógena transmitida por los alimentos varía alrededor del mundo. En comunidades con una mala sanidad e higiene, son frecuentes *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC) y enteropatógena (EPEC). Se adquiere a través del consumo de alimentos y agua contaminada, y por la contaminación cruzada a través del contacto humano directo. (p. 5).

Además, la FAO (2011) plantea que los animales bovinos son reservorios de *E. coli*, la cual es excretada a través de las heces, en nuestro entorno se observan animales en pastoreo libremente, los cuales producen una gran diseminación de material fecal, la cual contamina los suelos, el agua y el alimento de estos.

3.1.2 Contaminación de *Salmonella spp* en alimentos

La contaminación por *Salmonella* es muy común en nuestro medio, ya que se reflejan consultas en los sistemas de salud por enfermedades gastrointestinales y en algunos casos se ha confirmado el agente causal siendo la *Salmonella*; esto se debe a lo siguiente:

la amplia distribución de *Salmonella* entérica en el entorno, su prevalencia en la cadena alimentaria global, su virulencia y adaptabilidad tienen un enorme impacto en medicina, en salud pública y en la economía, dado el incremento de los brotes que se presentan a nivel mundial. (Junod et al., 2013, p. 1)

Se conoce ampliamente que la *Salmonella* se asocia con las aves, principalmente por las heces de estas y que puede propagarse fácilmente, así como encontrarse en aves y huevos; para Junod (2013) “el principal reservorio de *Salmonella* corresponde al tracto gastrointestinal de mamíferos, reptiles, aves e insectos, domesticados y salvajes. Estos animales jugarían un importante rol en la diseminación de este microorganismo en el medioambiente” (p. 1).

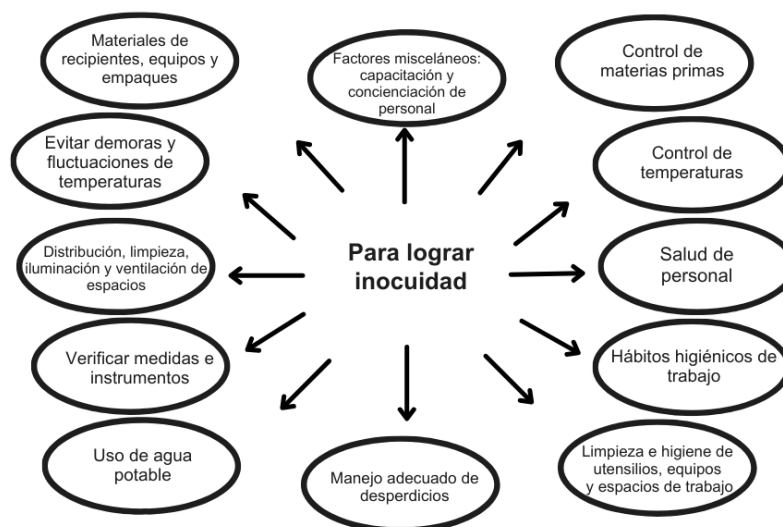
3.2 Inocuidad de los alimentos

El Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria, OIRSA, (2018) menciona que “la inocuidad es la característica intrínseca de un alimento de no causar daño al ser ingerido como está indicado (no implica que este sea saludable)” (p. 10). El consumidor asume la inocuidad de su alimento y que, al ser ingerida, esta no es considerada dañina.

Para lograr la inocuidad en los alimentos, se presentan factores críticos a ser considerados y las medidas recomendadas para el alimento de cualquier origen que se preparan o procesan para el consumo humano, los cuales se pueden identificar en la figura 1.

Figura 1

Factores para lograr la inocuidad.



Nota: Adaptado de *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico* (p. 6) por FAO, 2009.

3.3 La leche

La leche es un alimento consumido por las familias salvadoreñas, una práctica en el campo es el consumo de leche cruda, según la Norma Salvadoreña Obligatoria 67.01.01:06 define la leche cruda de vaca como:

el producto íntegro, no alterado ni adulterado de la secreción de las glándulas mamarias de las hembras del ganado bovino obtenida por el ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de vacas sanas y libre de calostro; que no ha sufrido ningún tratamiento a excepción del filtrado y/o enfriamiento, y está exento de color, olor, sabor y consistencia anormales (p. 3).

Sin embargo, también se define como leche cruda a aquella que “no ha sido calentada a más de 40°C ni sometida a ningún tratamiento que tenga un efecto equivalente (Gobierno de Perú, 2004, p. 5).

La leche, por sus características fisicoquímicas y nutricionales, es un medio favorable para el crecimiento y la multiplicación de microorganismos patógenos, y puede llegar a convertirse en un vehículo para la transmisión de enfermedades a las personas. Los microorganismos patógenos causantes de zoonosis pueden llegar a la leche a través de la glándula mamaria, independiente de si la vaca muestra signos de enfermedad durante el ordeño (Oliver et al., 2009).

Las condiciones de ordeño y la salud animal del hato nos pueden indicar una calidad de la leche a través de la higiene, Aguilera et al., (2014) plantea lo siguiente:

la calidad higiénica de la leche cruda es el efecto de las condiciones del entorno de la vaca en el momento del ordeño; en consecuencia, la contaminación encontrada se debe a las malas prácticas de higiene en la rutina de ordeño, las cuales favorecen el aumento de las bacterias patógenas que afectan la calidad e inocuidad del producto (p. 2).

Sin embargo, la limpieza de la ubre no solo está determinada por la higiene del ordeño, sino también por la higiene general del hato, establos sucios, humedad excesiva y fuentes de contaminación dentro de la granja también determinan la calidad higiénica de la leche producida.

Además, *Aguilera et al., (2014)* plantea que “la leche cruda puede contaminarse en cualquiera de las etapas, durante su obtención, almacenamiento y

comercialización, con microorganismos patógenos (p. 4). Los microorganismos más comunes que están involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos se clasifican en la Tabla 2, como microorganismos patógenos, facilitadores de fermentación láctea y otros que causan deterioro en los alimentos.

Tabla 2

Microorganismos en leche cruda

Microorganismos patógenos generadores de alertas alimentarias	Microorganismos facilitadores de fermentación láctea	Microorganismos que causan deterioro en el alimento
<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactococcus</i> sp	<i>Pseudomonas</i> sp
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Clostridium</i> sp
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i> sp	<i>Bacillus</i> sp
<i>Salmonella</i> spp	<i>Propionibacterium</i> sp	
<i>Campylobacter jejuni</i>		
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Yersinia enterocolitica</i>		
<i>Brucella abortus</i>		
<i>Streptococcus agalactiae</i>		

Nota. Adaptado de *Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria* (p. 86) por Aguilera *et al.*, 2014, Ciencia y Agricultura

3.3.1 Calidad higiénica de la leche

Es importante comprender que la calidad higiénica de la leche se refiere “a todas aquellas prácticas de manejo en finca que lleva consigo el control de la

mastitis” (*Moreno et al., 2007, p. 3*). Además, existen otros aspectos que se pueden evaluar entre los cuales se evalúa la calidad de la leche cruda a partir del “recuento de bacterias mesófilas aerobias; valores menores de 300000 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mL, es el indicador de la calidad higiénica” (*Moreno et al., 2007, p. 3*).

3.3.2 Calidad sanitaria de la leche

Para definir la calidad sanitaria de la leche *Moreno et al. (2007)*, lo plantea que “la buena calidad sanitaria referencia la ausencia de microorganismos patógenos como *Salmonella*, Coliformes totales, Coliformes fecales y *Listeria monocytogenes* entre otros, que son causantes de enfermedades asociadas con infecciones e intoxicaciones generadas por el consumo de alimentos contaminados”. (p.64).

3.3.3. Calidad microbiológica de la leche

La calidad microbiológica de la leche está determinada por la carga microbiológica que esta puede tener debido a una diversidad de factores o fuentes de contaminación, en el estudio realizado por el análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénico y sanitaria de la leche producida en la región del alto de Chicamocha, *Moreno et al. (2007)*, plantea lo siguiente:

la leche tiene múltiples fuentes de contaminación, en donde la ubre en condiciones normales puede aportar hasta 1000 microorganismos/mL; la ubre con mastitis donde, dependiendo del microorganismo que la cause, un solo cuarto afectado mezclado con la leche, puede incrementar el recuento de hasta 100000 UFC/mL en la leche del hato; la contaminación ambiental durante el ordeño, permite que microorganismos de la piel de

los pezones, manos del ordeñados, pezoneras, equipos de ordeño, baldes y todo el entorno del ordeño, lleguen a la leche (p. 4).

Entre las aportaciones de Gaviria (2007), realiza el siguiente planteamiento en relación al grado de contaminación de la leche, estableciendo que:

en la leche cruda se pueden investigar diferentes tipos de microorganismos, que permiten obtener información sobre la magnitud de la contaminación y la fuente más probable de la misma. El recuento de mesófilos aerobios (RMA) indica el grado de contaminación total de la leche cruda, sin capacidad para diferenciar cuál es el origen. El recuento de coliformes totales tiene origen en la contaminación directa, o indirecta con materia fecal (p. 3).

Según la Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.01:06 Productos Lácteos. Leche Cruda de Vaca. Especificaciones (Primera actualización) establece que la leche de vaca se clasifica en Grado A, Grado B, y Grado C, de acuerdo con los requisitos microbiológicos los cuales se representan en la Tabla 3.

Tabla 3

Requisitos microbiológicos para clasificar la leche cruda según el Grado, de acuerdo con la Norma Salvadoreña Obligatoria para leche cruda de vaca

Características	Grado A	Grado B	Grado C
Recuento total de microorganismos por mililitro	Menor o igual a 300 000	Mayor a 300 000 y menor o igual a 600 000	Mayor a 600 000 y menor a 900 000

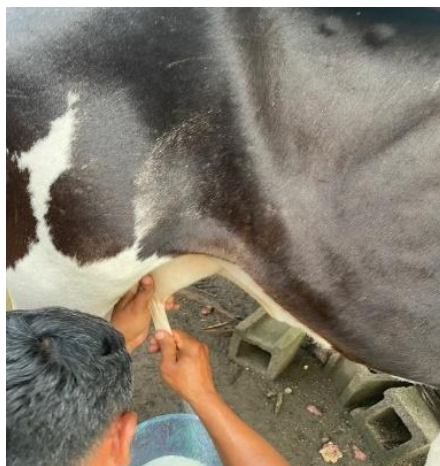
Nota. Adaptado de NSO 67.01.01:06 Productos Lácteos. Leche Cruda de Vaca. Especificaciones (p. 3) por Comité Técnico de Normalización, 2006, CONACYT.

3.4 Buenas Prácticas de Ordeño

Las buenas prácticas de ordeño son importantes para garantizar un proceso de ordeño más higiénico en las ganaderías; el cual contribuirá a tener condiciones adecuadas para realizar dicha práctica; así también lo afirma Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID, s.f.) definiendo “las Buenas Prácticas de Ordeño (BPO) son prácticas que, al realizarlas todos los días, antes, durante y después del ordeño permiten garantizar una leche de calidad”. Antes del ordeño se deberá contar con la limpieza de la sala, el arreado de la vaca que le permita la tranquilidad y buen trato, proporcionándole una buena estimulación durante el ordeño, además de cumplir con un horario fijo de ordeño. Se deberá realizar una correcta sujeción del animal, luego es muy importante el lavado adecuado de manos y brazos, junto a la preparación de los utensilios.

Figura 2

Lavado correcto de pezones previo al proceso de ordeño.



Durante el ordeño, el operario deberá colocarse la vestimenta adecuada, realizará el lavado correcto de los pezones según Figura 2, realizando el

despunte, que eliminará el primer contenido de la ubre, posteriormente se colocará un pre-sellado y secado de los pezones, como se visualiza en la figura 3, finalizando el ordeño con la extracción de la leche en el recipiente y se sellan los pezones para evitar cualquier contaminación.

Figura 3

Materiales para la limpieza y desinfección de ubres durante el proceso de ordeño.



3.5 Ensilado

El ensilado es una de las fuentes de alimentación del ganado bovino tanto lechero como de doble propósito, aunque no es la única fuente de alimentación por los costos que esto genera para las ganaderías; aunque para *Queiroz et al. (2018)* “el ensilado es uno de los principales ingredientes de las dietas del ganado lechero y es una fuente importante de nutrientes, especialmente energía y fibra digestible”.

Existen varios aspectos que se deben considerar para determinar un ensilado de buena calidad, *Queiroz et al. (2018)*, hace el siguiente planteamiento sobre el ensilado de acuerdo con el proceso de elaboración:

a diferencia del ensilado hecho y gestionado adecuadamente, el ensilado mal elaborado o contaminado también puede ser una fuente de bacterias patógenas que pueden disminuir el rendimiento de las vacas lecheras, reducir la seguridad y la calidad de los productos lácteos, y comprometer la salud animal y humana (p. 1).

Entre los planteamientos realizados por *Queiroz (2018)*, en su estudio de revisión de ensilaje: patógenos transmitidos por los alimentos en el ensilado y su mitigación mediante aditivos de ensilado plantea que “los ensilados mal hechos o contaminados pueden albergar patógenos”. También planteó que:

el ganado es el principal reservorio de ciertos microorganismos patógenos como *Escherichia coli* O157 H7, que puede ingresar a las lagunas de purines a través del estiércol de ganado y posteriormente irrigado en los cultivos. En consecuencia, el ensilado, al igual que otros alimentos para el ganado, puede ser un vehículo importante de transmisión de patógenos en la granja.

La fermentación inadecuada del ensilaje y el mal manejo de la alimentación del ensilaje favorecen la proliferación de patógenos en el ensilaje. Los microorganismos patógenos más comunes que se encuentran en el ensilado son *Escherichia coli*, particularmente *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* spp, *Salmonella* y *Clostridium* spp (p. 1).

La regulación de la República de Serbia (2009) sobre “la calidad de los piensos; regula determinadas bacterias patógenas, *Salmonella*, *Clostridium botulinum*,

Clostridium perfringens, *Estaphylococcus* y una categoría denominada otros microorganismos”

Según *Ksenija et al. (2021)* el actual reglamento sobre la calidad de la alimentación animal incluye criterios microbiológicos y que el cambio recomendable que llevaría a:

la categorización de la alimentación animal está de acuerdo a los criterios más objetivos y completos basados en el método VDLUFA (Verbands Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs und Forsschungsanstalten). En varios países europeos, se ha convertido en una rutina, debido al gran interés de los productores de piensos y los criadores de animales ya que les permitirá obtener conocimiento sobre la calidad microbiológica de sus productos como garantía de un producto final saludable.

El método VDLUFA establece los valores de orientación para la alimentación de la clase de calidad I (calidad deseable), como grupo de indicadores de microorganismos tenemos las bacterias aeróbicas mesófilas $\times 10^6$ UFC/gramo, donde para el ensilado el grupo I debe contener 0.4, grupo II 0.2 y grupo III 0.03 (p. 3).

CAPÍTULO IV
METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

4.1 Metodología del estudio

4.1.1 Estudio prospectivo

Se determinó a partir de la toma y análisis de las muestras en el laboratorio.

4.1.2 Estudio experimental

Se seleccionaron las ganaderías que cumplían con las características: ordeño manual con sistema estabulado permanente del ganado lechero y brindar alimentación complementaria con cualquier tipo de ensilado. Las ganaderías en estudio estaban distribuidas en tres regiones del país (occidental, paracentral y central).

4.2 Muestra

En total se tomaron nueve ganaderías, se seleccionaron tres regiones del país, para realizar el estudio, las cuales son: región occidental, central y paracentral, de las cuales se seleccionaron tres ganaderías, como parte de las unidades de estudios, en cada una de estas ganaderías, se tomaron muestras de ensilado, leche, ubre y superficies para la determinación de *Salmonella* spp y *Escherichia coli*. Cada una de las ganaderías cumplían las características de ordeño manual, alimentación complementaria con ensilado y el manejo de un sistema estabulado permanente del ganado lechero (ver anexo C).

Tabla 4*Ganaderías seleccionadas para el estudio (ver anexo I)*

Zona	Ganadería	Dirección
Paracentral	1	Caserío El Júcaro, San Ildefonso
Paracentral	2	El Pichiche, San Ildefonso
Paracentral	3	Caserío El Portillo, San Ildefonso
Central	4	Nueva Concepción, Chalatenango
Central	5	Suburbios de Agua Caliente, Chalatenango
Central	6	Suburbios de Agua Caliente, Chalatenango
Occidente	7	Candelaria de la Frontera, Santa Ana
Occidente	8	Texistepeque, Santa Ana
Occidente	9	Metapán, Santa Ana.

Para la recolección de muestras de ensilado se realizará con los materiales adecuados y el procedimiento especial para ello.

Materiales:

Bolsas plásticas para muestras con cierre hermético

Hielera

Procedimiento:

El ensilado que se analizó es aquel con el que se alimentaba al ganado; se recogieron dos muestras, la toma de muestra se realizó de manera manual, tomando ocho submuestras del producto, de diversas zonas del frente del ensilado siguiendo una forma de “W” en el perfil del silo. Se descartaron los primeros 50 cm de este ya que, en la apertura del ensilado, ese es el sector que se encuentra más expuesto al contacto con el aire y puede estar deteriorado,

así como se evitaron porciones de las zonas del borde y piso, ya que pudieron estar alterados (ver anexo E).

Una vez colectadas las submuestras se homogenizaron las mismas y se subdividieron para tomar la porción de muestra representativa a enviar al laboratorio. Las muestras fueron transportadas en bolsas de plástico herméticas, con su respectiva identificación, utilizando doble bolsa para conservarlas. El tamaño de la muestra fue de aproximadamente 500 gramos y se mantuvo en cadena de frío (hielera de 7°C a 8°C) hasta su procesamiento. Para la recolección de muestras de leche se realizará con los materiales adecuados y el procedimiento especial para ello.

Materiales:

Bolsas plásticas para muestras con cierre hermético

Hielera

Procedimiento:

En cada ganadería se tomó una muestra representativa del tanque, donde fue colectada la leche de las vacas en lactancia que han consumido el ensilado muestreado. El tamaño de la muestra fue de 200 mL, colectado en bolsa plástica con cierre hermético, rotulada con el nombre de la ganadería, fecha y hora de la toma. Posteriormente se colocó en la hielera con temperatura de 4°C para ser transportada al laboratorio, sin exceder en un tiempo máximo de 24 horas (ver anexo D).

Para la recolección de muestras de superficies vivas se realizará con los materiales adecuados y el procedimiento especial para ello.

Materiales:

Hisopo con medio de transporte (caldo neutralizante)

Guantes descartables de primer uso

Protector de cabello

Mascarillas descartables

Hielera

Procedimiento:

Consiste en frotar un hisopo estéril previamente humedecido en una solución diluyente y se presionó ligeramente en la pared del tubo con un movimiento de rotación para quitar el exceso de solución (ver anexo H). Con el hisopo inclinado en un ángulo de 30°, se frotó 4 veces la superficie en cada uno de los pezones, tomando en cuenta la dirección una opuesta a la anterior. Posteriormente se colocó el hisopo en el tubo con la solución diluyente y se enrosca para transportarlo hacia el laboratorio en una hielera a menos de 10°C (ver anexo F).

Para la recolección de muestras de superficies inertes se realizará con los materiales adecuados y el procedimiento especial para ello.

Materiales:

Hisopo con medio de transporte (caldo neutralizante)

Guantes descartables de primer uso

Protector de cabello

Mascarillas descartables

Hielera

Procedimiento:

Se realizó el muestreo por medio de la técnica de hisopado del borde y superficie interna del recipiente que colecta la leche, ya que éste tiene contacto directo con la misma (ver anexo H). Posteriormente, el hisopo se sumergió en un tubo con la solución transportadora y fue colocado en una hielera a una temperatura inferior a 10°C (ver anexo G).

4.3 Análisis microbiológico

4.3.1 Determinación de *E. coli* en leche, por recuento en placa Petrifilm (Método 991.14 AOAC)

Se procesaron las muestras de leche según metodología (ver anexo B).

Materiales y equipo	Medios y reactivos
- Pipetas de 1 mL estériles	- Agua dilución fosfato buferada de Butterfield
- Pipeteador	- Placas Petrifilm para recuento de <i>E. coli</i> /coliformes
- Pipeta repetidora de 1000 μ L	
- Puntas descartables de 1000 μ L	
- Tubos de Ensayo (18 x 150) mm con tapón de rosca	
- Gradillas	
- Stomacher	
- Esparcidores plásticos de placas petrifilm (difusor)	
- Bolsas estériles para Stomacher	
- Bajalenguas estériles	
- Guantes, gorros, mascarilla	
- Balanza semianalítica	
- Incubadora 35 \pm 1 $^{\circ}$ C	
- Contador de colonias	
- Cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922 o su equivalente	
- Cepa de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 o su equivalente.	

Procedimiento:

Preparación de la muestra

- Se midieron 25 mL de muestra en bolsa estéril y se adicionó 225 mL de agua buferada de Butterfield, agitándose en Stomacher por 30 segundos para homogenizar y luego se trasegó el homogenizado al frasco de dilución y se cierra la bolsa.
- Se prepararon series de diluciones de 1:10, 1:100.

Inoculación

- Se colocó la placa Petrifilm para el conteo de *E.coli*/coliformes en una superficie plana y nivelada.
- Se procedió a levantar la película superior y con la pipeta perpendicular se dispuso 1 mL de la suspensión de la muestra en el centro de la película inferior de la placa.
- Luego se bajó la película superior con cuidado, evitando introducir burbujas de aire.
- Posteriormente se colocó el difusor plástico con el lado plano hacia abajo en el centro de la placa, presionando suavemente en el centro del difusor para distribuir la muestra uniformemente.
- Se retiró el difusor y se dejó reposar la placa al menos un minuto para permitir que se forme el gel.
- Este procedimiento se repitió cada vez que se inoculó otra dilución de la muestra.
- Finalmente se incubaron las placas a $35 \pm 1^{\circ}$ C por 24 ± 2 horas para coliformes totales y un total de 48 ± 2 horas para el conteo de *E. coli*.

Lecturas y cálculos

Conteo de coliformes totales: Las colonias rojas asociadas a formación de burbujas de gas se confirmaron como coliformes totales. Se contaron todas las colonias en un rango contable de 15-150, donde las colonias rojas sin formación de gas no se contaron como organismos coliformes.

Conteo de *E. coli*: Las colonias azules o rojo azulado asociadas con burbujas de gas como colonias confirmadas *E. coli*, se multiplicaron por el factor de dilución utilizado. Se contaron todas las colonias en un rango contable de 15-150. Cuando en las placas el número de colonias fue mayor a 150, se hizo un recuento estimado. Se determinó el promedio de colonias en un centímetro cuadrado y se multiplicó por 20 para obtener el recuento total de la placa. Ya que el área de crecimiento de las placas Petrifilm es de aproximadamente 20 cm².

4.3.2 Determinación de *E. coli* en ensilado por recuento en placa Petrifilm (Método 991.14 AOAC)

Se procesaron las muestras de ensilado según metodología (ver anexo B).

Materiales y equipo	Medios y reactivos
- Pipetas de 1 mL estériles	- Agua dilución fosfato buferada de Butterfield
- Pipeteador	- Placas Petrifilm para recuento de <i>E. coli/coliformes</i>
- Pipeta repetidora de 1000µL	
- Puntas descartables de 1000µL	
- Tubos de Ensayo (18 x 150) mm con tapón de rosca	
- Gradillas	
- Stomacher	
- Esparcidores plásticos de placas	

- petrifilm (difusor)
- Bolsas estériles para Stomacher
 - Bajalenguas estériles
 - Guantes, gorros, mascarilla
 - Balanza semianalítica
 - Incubadora $35 \pm 1^\circ \text{C}$
 - Contador de colonias
 - Cepa de *E. coli* ATCC 25922 o su equivalente
 - Cepa de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 o su equivalente

Procedimiento:

Preparación de la muestra

- Se pesaron 25 gramos de muestra en bolsa estéril y se le agregó 225 mL de agua buferada de Butterfield, se agitó en Stomacher por 30 segundos para homogenizar y luego se trasegó el homogenizado al frasco de dilución, posteriormente se tapó.
- Se prepararon unas series de diluciones de 1:10, 1:100, las diluciones que fueron necesarias.

Inoculación

- Se colocaron las placas Petrifilm para el conteo de *E. coli* /coliformes en una superficie plana y nivelada.
- Se procedió a levantar la película superior y con la pipeta perpendicular se colocó 1 mL de la suspensión de la muestra en el centro de la película inferior de la placa.

- Luego se bajó la película superior con cuidado, evitando introducir burbujas de aire.
- Se colocó el difusor plástico con el lado plano hacia abajo en el centro de la placa, se presionó suavemente en el centro del difusor para distribuir la muestra uniformemente. Con el cuidado de no deslizar el difusor sobre la placa.
- Luego se retiró el difusor y dejó reposar la placa al menos un minuto para permitir que se forme el gel.
- Este procedimiento se repitió cada vez que se inoculó, otra dilución de la muestra.
- Finalmente se incubaron las placas a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 ± 2 horas para coliformes totales y un total de 48 ± 2 horas para el conteo de *E. coli*.

Lecturas y cálculos

Conteo de coliformes totales: Las colonias rojas asociadas a formación de burbujas de gas se confirmaron como coliformes totales. Se contaron todas las colonias en un rango contable de 15-150. Las colonias rojas sin formación de gas no se consideraron como organismos coliformes.

Conteo de *E. coli*: Se contaron las colonias azules o rojo azulado asociadas con burbujas de gas como colonias confirmadas *E. coli* y se multiplicó por el factor de dilución utilizado. Se contaron todas las colonias en un rango contable de 15-150.

No se contaron las colonias que aparecen en la barrera de espuma, debido a que éstas se encuentran lejos de la influencia selectiva del medio, ya que cuando el número de colonias es mayor a 150, se realiza un recuento estimado. Finalmente, se determinó el promedio de colonias en un centímetro cuadrado y multiplicó por 20 para obtener el recuento total de la placa. El área de crecimiento de las placas Petrifilm es de aproximadamente 20 cm^2 .

4.3.3 Determinación de *E. coli* en superficies vivas e inertes (Método 991.14 AOAC)

Se procesaron las muestras de ensilado según metodología (ver anexo B).

Materiales y equipo	Medios y reactivos
<ul style="list-style-type: none"> - Pipetas de 1 mL estériles - Pipeteador - Pipeta repetidora de 1000µL - Puntas descartables de 1000µL - Tubos de Ensayo (18 x 150) mm con tapón de rosca - Gradillas - Stomacher - Esparcidores plásticos de placas Petrifilm (difusor) - Bolsas estériles para Stomacher - Bajalenguas estériles - Guantes, gorros, mascarilla - Balanza semianalítica - Incubadora 35 ±1° C - Contador de colonias - Cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922 o su equivalente - Cepa de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 o su equivalente. 	<ul style="list-style-type: none"> - Agua dilución fosfato buferada de Butterfield - Placas Petrifilm para recuento de <i>E. coli</i>/coliformes

Inoculación

- Se colocaron las placas Petrifilm para el conteo de *E. coli* en una superficie plana y nivelada.
- Se procedió a levantar la película superior y con la pipeta perpendicular se agregó 1 mL de la suspensión de la muestra hisopada, en el centro de la película inferior de la placa.
- Luego se bajó la película superior con cuidado, evitando introducir burbujas de aire.
- Se colocó el difusor plástico con el lado plano hacia abajo en el centro de la placa, presionando suavemente en el centro del difusor para distribuir la muestra uniformemente. Con el cuidado de no deslizar el difusor sobre la placa.
- Se retiró el difusor y se dejó reposar la placa al menos un minuto para permitir que se forme el gel.
- Este procedimiento se repitió cada vez que se inocule otra dilución de la muestra.
- Se incubaron las placas a 48 ± 2 horas para el conteo de *E. coli*.

Lecturas y cálculos

Conteo de coliformes totales: Las colonias rojas asociadas a formación de burbujas de gas se confirmaron como coliformes totales. Se contaron todas las colonias en un rango contable de 15-150. Las colonias rojas sin formación de gas no se contaron como organismos coliformes.

Conteo de *E. coli*: Se contaron las colonias azules o rojo azulado asociadas con burbujas de gas como colonias confirmadas *E. coli* y se multiplicaron por el factor de dilución utilizado. Se contaron todas las colonias en un rango contable de 15-150.

No se contaron las colonias que aparecen en la barrera de espuma, debido a que éstas se encuentran lejos de la influencia selectiva del medio. Cuando el número de colonias fue mayor a 150, se realizó un recuento estimado.

Se determinó el promedio de colonias en un centímetro cuadrado y se multiplicó por 20 para obtener el recuento total de la placa. Ya que el área de crecimiento de las placas Petrifilm es de aproximadamente 20 cm².

4.3.4 Determinación de *Salmonella* spp en leche y ensilado (BAM, FDA Ch.5 Online)

Para realizar esta prueba, se procesaron las muestras de leche y ensilado según metodología descrita (ver anexo A).

Materiales y equipo	Medios y reactivos
- Pipetas estériles de 1 mL, 10 mL (descartables o de vidrio)	- Agua peptonada 1%
- Micropipetas con capacidad de 100µL, 200 µL y/o 1000 µL.	- Caldo Rappaport – Vassiliadis (CRV)
- Pipeteador	- Caldo Tetrionato verde brillante (MKTTn)
- Cajas de petri 100 x 15 mm, de una cavidad. Descartable	- Agar Sulfito Bismuto (SB)
- Tubos de vidrio con tapón de rosca de 20x150 mm	- Agar Xilosa – Lisina-Desoxicolato (XLD)
- Tubos de vidrio con tapón de rosca de 13x100 mm	- Agar Hektoen (HE)
- Frascos de vidrio con tapón de rosca con capacidad para 250 mL o 500 mL	- Agar MacConkey (McC)
- Baño de agua a 43±0.2° C, 42 ± 0.2°	- Agar tripticasa soya (TSA)
	- Caldo tripticasa soya (TSB)
	- Leche descremada en polvo reconstituida
	- Agar hierro triple azúcar (TSI)

- Incubadora 35° ±1° C
- Contador de colonias
- Stomacher
- Bolsas para Stomacher
- Asas bacteriológicas en anillo (de 3 mm o 10 µL) o palillos estériles
- Asas bacteriológicas en punta
- Puntas descartables de 100µL, 200 µL y 1000 µL.
- Mechero Bunsen
- Cucharas, pinzas o bajalenguas estériles para la transferencia de muestras de alimentos
- Balanza semianalítica
- Agitador Vortex
- Gradilla
- Guantes, gorros, mascarillas
- Cabina de flujo laminar
- Autoclave
- Agar Hierro Lisina (LIA) inclinado
- Caldo urea
- Agua verde brillante (Preparar el agua verde brillante añadiendo 2 mL de solución verde brillante 1 % por 1000 mL de agua destilada estéril).
- Solución de Verde brillante al 0.1 % (preparado con agua estéril)
- Solución de verde brillante 1%
- Solución de yodo/yoduro (preparado con agua estéril)
- Galería bioquímica miniaturizada (API 20E)

Preparación de muestra

Se pesó asépticamente 25 g o mL de muestra y se mezcló con 225 mL de Agua peptonada 1%.

Enriquecimiento

- Se agitó cuidadosamente el cultivo de pre-enriquecimiento.
- Se incubaron los medios para enriquecimiento selectivo.

- Se transfirió 0.1 mL del cultivo obtenido del pre-enriquecimiento a un tubo con 10 mL de CRV y se incubó a $42^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Agitándose con Vortex.
- Previo a su uso, se adicionó a 10 mL de caldo MKTTn, 100 μL de solución verde brillante 0.1 % y 200 μL de solución yodo/yoduro.
- Se transfirió 1 mL del cultivo obtenido del pre-enriquecimiento a un tubo con 10 mL de MKTTn e incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Agitándose con Vortex.

Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp

- A partir de los cultivos obtenidos en los distintos caldos selectivos se procedió a estriar con asa o palillos de madera estériles, en placas de Petri que contengan Agar SB, Agar XLD, y Agar HE.
- Incubando durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Al haber examinado las placas después de la incubación para la determinación de la presencia de colonias que pueden ser *Salmonella*; la morfología típica de las colonias de *Salmonella*, se describe a continuación:
 - a) Agar entérico Hektoen (HE). Colonias azul-verdosas a azules con o sin centro negro. Muchos de cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con centro negro grande, brillante, o pueden aparecer casi completamente negras.
 - b) Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD): Colonias rosadas con o sin centro negro. Muchos de los cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con centro negro grande, brillante, o pueden aparecer casi completamente negras.

- c) Agar Sulfito bismuto (SB): Colonias café, grises o negras; a veces tienen brillo metálico. El medio alrededor usualmente se torna café al principio, pero puede volverse negro cuando el tiempo de incubación aumenta, produciendo el llamado “efecto halo”.

Confirmación bioquímica

- Se tomaron 2 colonias con aspecto típico de *Salmonella* a partir de cada uno de los medios selectivos utilizados.
- Con un asa en punta estéril, se tocó ligeramente el centro de la colonia a ser aislada, y se inoculó en Agar inclinado TSI y Agar inclinado LIA.

Agar TSI: Se inoculó utilizando asa en punta por estriado del bisel y punción en el fondo. Incubándose los tubos con las tapas sin apretar para mantener condiciones aeróbicas durante la incubación y así prevenir la producción excesiva de H₂S. Posteriormente se incubó a 35°C ± 1°C durante 24 h ± 2 h.

Agar LIA: Con la misma asa y sin flamear, se inoculó en Agar LIA inclinado por punción en el fondo dos veces y luego se procedió a estriar el bisel. Incubándose los tubos con las tapas sin apretar para mantener condiciones aeróbicas durante la incubación y así prevenir la producción excesiva de H₂S.

Posteriormente se incubó a 35°C ± 1°C durante 24 h ± 2 h. (El agar inclinado LIA contiene un fondo profundo de alrededor 4 cm, ya que la reacción de la descarboxilación de lisina es estrictamente anaerobia). Finalmente se almacenaron las placas de agar selectivo en refrigeración.

El género *Salmonella* produjo en TSI reacción alcalina (color rojo-rosado) en el bisel y coloración amarilla en el fondo, con producción de H₂S (ennegrecimiento del agar) y gas. En LIA el medio se mantuvo morado y hubo producción de H₂S (ennegrecimiento del agar).

Identificación de *Salmonella*

Cultivos mixtos. Se estriaron los cultivos de Agar TSI que parecían ser mixtos en agar MacConkey, agar HE o agar XLD. Incubándose a 35°C ± 1°C durante 24 h ± 2 h. Posteriormente se examinaron las placas para la presencia de colonias sospechosas de *Salmonella*:

Agar MacConkey: Colonias típicas aparecen transparentes e incoloras, a veces con centro negro.

Agar HE y Agar XLD: Se transfirió al menos 2 colonias sospechosas de *Salmonella* a TSI y LIA.

Cultivos puros

Prueba de Ureasa. Con asa en punta estéril, se inoculó el crecimiento de cada prueba presuntiva positiva de TSI, en tubos conteniendo Caldo Urea. Incubándose a 35°C ± 1°C durante 24 h ± 2 h. Ya que de vez en cuando, algunos tubos con caldo urea sin inocular se tornan rojo-púrpura (prueba positiva) estando en reposo, además se incluyó tubos de dicho caldo sin inocular como control. Incubándose a 35°C ± 1°C durante 24 h ± 2 h.

Finalmente, de resultar reacciones típicas a *Salmonella* en TSI, LIA y Urea. Alternativamente a la bioquímica convencional, se pueden utilizar kits bioquímicos comerciales (API 20E, Enterotubo II, Enterobacteriaceae II, Micro-ID o Vitek 2 GN), para identificación del género *Salmonella*. Por lo que se montan los materiales y se preparan los reactivos necesarios para el kit respectivo. Se inoculó cada unidad acorde a las instrucciones del fabricante, incubando por el tiempo y la temperatura especificados. Se añadieron los reactivos (en caso aplique), observando y registrando los resultados. De acuerdo con los resultados se indicó presencia o ausencia de *Salmonella* spp/25 g o mL.

4.3.5 Determinación de *Salmonella* spp en superficies vivas e inertes (BAM, FDA Ch.5 Online)

Para realizar esta prueba, se procesaron las muestras de hisopado en ubres y superficies (ver anexo A). La muestra se encontraba en un tubo con hisopo conteniendo caldo neutralizante y se incubó a una temperatura de 35°C por 24 horas.

Enriquecimiento

- Se transfirió 0.1 mL del cultivo obtenido del pre-enriquecimiento a un tubo con 10 mL de CRV y se incubó a 42°C \pm 0.2 °C durante 24 h \pm 2 h. Agitándose con Vortex.
- Previo a su uso, se adicionó a 10 mL de caldo MKTTn, 100 μ L de solución verde brillante 0.1 % y 200 μ L de solución yodo/yoduro.
- Se transfirió 1 mL del cultivo obtenido del pre-enriquecimiento a un tubo con 10 mL de MKTTn y se incubó a 35°C \pm 2.0 °C durante 24 h \pm 2 h. Agitándose con Vortex.

Aislamiento

- A partir de los cultivos obtenidos en los distintos caldos selectivos se estriaron con asa o palillos de madera estériles, en placas de Petri que contenían agar SB, agar XLD, y agar HE.
- Se incubó durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$.
- Al haber examinado las placas después de la incubación para la determinación de la presencia de colonias que pueden ser *Salmonella*; la morfología típica de las colonias de *Salmonella* se describió a continuación:
 - a) Agar entérico Hektoen (HE). Colonias azul-verdosas a azules con o sin centro negro. Muchos de cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con centro negro grande, brillante, o pueden aparecer casi completamente negras.
 - b) Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD): Colonias rosadas con o sin centro negro. Muchos de los cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con centro negro grande, brillante, o pueden aparecer casi completamente negras.
 - c) Agar sulfito bismuto (SB): Colonias café, grises o negras; a veces tienen brillo metálico. El medio alrededor usualmente se torna café al principio, pero puede volverse negro cuando el tiempo de incubación aumenta, produciendo el llamado “efecto halo”.

De acuerdo con los resultados indicar presencia o ausencia de *Salmonella* spp/25 g o mL.

Se procesaron las muestras en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Ministerio de Agricultura y Ganadería a través de sus metodologías acreditadas, debido a la falta de disponibilidad de los laboratorios de la Universidad de El Salvador, por el cierre sus instalaciones por juegos deportivos.

Resultados y análisis de datos de laboratorio.

La información recolectada se analizó inicialmente a través de una regresión lineal estableciendo la relación entre la abundancia de los diferentes microorganismos en leche y en el ensilado. Se utilizó la zona como covariable y la granja como efecto aleatorio en un modelo mixto. También se realizó un análisis de componentes principales para establecer las relaciones entre todas las variables dependientes e independientes. Todos los análisis se realizaron en el programa R (versión 4.1.3).

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Presentación de resultados y discusión de resultados

A partir de los resultados obtenidos del análisis microbiológico para la detección de *E. coli* y *Salmonella* spp de muestras de ensilado, leche, hisopado de superficie y ubre, de las nueve ganaderías de estudio, se presentan a través de tablas para el análisis de datos por medio de la identificación de crecimiento de *E. coli* y presencia de *Salmonella* spp en las diferentes muestras de las ganaderías de estudio.

Tabla 5

Crecimiento de E. coli en las diferentes muestras de las ganaderías de estudio

Región	Ganadería	Ensilado	Leche cruda	Ubre	Superficie
Paracentral	1	2000 UFC/g	<10 UFC/mL	420 UFC/mL	<10 UFC/mL
Paracentral	2	<10 UFC/g	30 UFC/mL	35 UFC/mL	240 UFC/mL
Paracentral	3	280 UFC/g	10 UFC/mL	1600 UFC/mL	60 UFC/mL
Central	4	<10 UFC/g	20 UFC/mL	10 UFC/mL	15 UFC/mL
Central	5	<10 UFC/g	10 UFC/mL	10 UFC/mL	290 UFC/mL
Central	6	10 UFC/g	<10 UFC/mL	45 UFC/mL	10 UFC/mL
Occidental	7	<10 UFC/g	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	260 UFC/mL
Occidental	8	<10 UFC/g	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL
Occidental	9	<10 UFC/g	120 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL

Del análisis de las muestras de ensilado tomadas en diversas ganaderías, se observa que, de las 9 muestras examinadas en el laboratorio, se encontró crecimiento de *E. coli* en 3 de ellas (ver anexos M, O y R). Este hallazgo sugiere una potencial fuente de contaminación, especialmente considerando que el ensilado se elaboró en áreas abiertas (utilizadas para el pastoreo del ganado), donde diversos animales como perros, cabras y caballos podrían acceder fácilmente. Además, el proceso de producción del ensilado no incluyó medidas de impermeabilización del suelo. En contraste, en otras ganaderías se dispone

de áreas específicas impermeabilizadas y exclusivas para la elaboración del ensilado, con acceso restringido.

En relación con los resultados de crecimiento de *E. coli* en la leche cruda, se observa que este patógeno estuvo presente en muestras de 5 ganaderías. En 4 de estas, también se detectó contaminación en las ubres y superficies, lo que sugiere posibles deficiencias en las prácticas de higiene de las instalaciones ganaderas. Teniendo un crecimiento de 120 UFC/mL en una de las muestras, mientras que las otras 4 mostraron niveles entre 10 y 30 UFC/mL. El valor más alto podría indicar la presencia de otros factores o fuentes de contaminación, los cuales no se incluyeron en los objetivos del estudio y, por lo tanto, no se puede confirmar con certeza.

En la actualidad no se cuenta con legislación nacional referente a los límites máximos permisibles de *E. coli* en leche cruda de vaca; pero teniendo como referencia el Real Decreto 1086/2020 de la Unión Europea, en donde se determinan los requisitos en relación con la comercialización de leche cruda destinada a la venta directa al consumidor; donde establece la no detección de *E. coli*; al encontrarse una unidad en la muestra, el resultado es insatisfactorio.

Los resultados de los hisopados de ubre y superficies revelaron crecimiento de *E. coli* en seis muestras de hisopado de ubre y otras seis muestras de hisopado de superficie. Estos hallazgos reflejan las deficiencias observadas durante las visitas de campo, donde los ordeñadores no aseguran una limpieza adecuada de las ubres durante el ordeño.

Además, no se remueve el exceso de excremento de las patas del ganado ni se realiza una limpieza previa del área donde se lleva a cabo esta práctica. Estas

prácticas inadecuadas aumentan significativamente el riesgo de contaminación de la leche debido a las deficientes condiciones higiénicas y la ausencia de un programa de buenas prácticas de ordeño.

Únicamente en la Ganadería 8 no se detectó crecimiento de *E. coli* en ninguna de las muestras analizadas. Esto se atribuye al hecho de que dicha ganadería dispone de un espacio exclusivo para el ordeño, donde se realiza una limpieza y desinfección del área de ordeño. Además, implementan un protocolo de lavado de ubres, patas y cola del ganado antes de ingresar al área de ordeño (ver anexo T).

De acuerdo con Fuentes-Coto,2013, en su estudio sobre análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación; establece que la presencia de *E. coli*, es un indicador de que hay problemas de contaminación durante el proceso. Dicha contaminación según El Center for Food Security and Public Health, 2009, reporta que *E. coli* enterohemorrágica causa diarrea o colitis hemorrágica en los humanos, siendo los bovinos y ovejas, el principal reservorio, ya que se infectan sin presentar síntomas y eliminan el organismo en las heces. Los humanos lo adquieren por contacto directo con los animales portadores, sus heces y el suelo o con el agua contaminada, a través de productos derivados de animales o vegetales contaminados.

Tabla 6

Presencia de Salmonella spp en las diferentes muestras de las ganaderías de estudio

Región	Ganadería	Ensilado	Leche cruda	Ubre	Superficie
Paracentral	1	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Paracentral	2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Paracentral	3	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Central	4	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Central	5	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Central	6	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Occidental	7	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Occidental	8	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Occidental	9	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

De las muestras analizadas para la determinación de *Salmonella* spp que en las ganaderías no hubo presencia de *Salmonella* spp en las diferentes muestras analizadas. A pesar de que en las ganaderías también se encontraban aves de traspatio, entre estos, pollos, patos y otros, que andan libres. De acuerdo con el Manual Terrestre de la OMSA, 2018, la Salmonelosis humana es una de las enfermedades zoonóticas más frecuentes y de importancia económica. Según CDC, 2013, se estima que en Estados Unidos se enferman cada año más de 1.2 millones de personas por esta enfermedad, ocasionando más de 23,000 hospitalizaciones y 450 muertes, causadas más frecuentemente por una gastroenteritis.

Tabla 7*Prácticas de ordeño identificadas en las ganaderías de estudio*

Región	Ganadería	Limpieza en área de ordeño	Lavado correcto de manos	Lavado de utensilios	Lavado, secado y sellado de pezones
Paracentral	1	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia
Paracentral	2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Paracentral	3	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia
Central	4	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia
Central	5	Presencia	Presencia	Ausencia	Presencia
Central	6	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia
Occidental	7	Presencia	Presencia	Ausencia	Presencia
Occidental	8	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
Occidental	9	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia

De las ganaderías donde se tomaron las muestras del estudio, se logró observar que no todas realizaban buenas prácticas de ordeño. De las cuales algunas efectuaban la limpieza en el área correcta para el ordeño, pero otras no contaban con instalaciones adecuadas y no permitían la eficiente limpieza; así como no practicaban la adecuada limpieza de manos de los ordeñadores y el lavado de utensilios y pezones se realizó con agua de consumo para el ganado, variable que no fue incluida en los resultados obtenidos.

5.2. Análisis estadístico de los resultados

5.2.1 Regresión lineal simple

La regresión lineal indica que el modelo no muestra una relación significativa entre la variable dependiente (leche) y la variable independiente (ensilado), dado que el valor p asociado con el coeficiente de ensilado es alto (0.596), lo

que sugiere que no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula de que el coeficiente es igual a cero. Además, el R-cuadrado relativamente bajo (0.04211) indica que el modelo no explica mucha variabilidad en la variable dependiente.

La relación de la variable dependiente y la variable independiente (ubre), existe una variabilidad del 3.51%, lo que indica que el modelo no explica mucha variabilidad en la variable dependiente basada en las variables independientes incluidas en el modelo.

En cuanto a la regresión lineal, de la variable independiente (superficie), existe una variabilidad del 4.34%, lo cual no explica mucha variabilidad con la variable dependiente. Esto sugiere que no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula.

De acuerdo a los datos obtenidos, se puede observar que las variables independientes no se identificaron como responsables de la contaminación de la leche; lo cual indica que podrían haber otras variables que no fueron consideradas en el estudio, que pudieran estar relacionada con la variable dependiente; según algunos estudios consultados, una fuente de contaminación de la leche está relacionado con la contaminación por el estiércol del ganado, esto debido al manejo inadecuado en las ganaderías.

También podemos decir que el número de unidades de estudio fue muy limitado para poder establecer una diferencia notable y poder ampliar el análisis y la relación entre las variables de estudio; esto debido a que no se contaba con más presupuesto para ampliar el número de ganaderías; además, del limitado acceso a las ganaderías por la reserva en el manejo de la agroindustria,

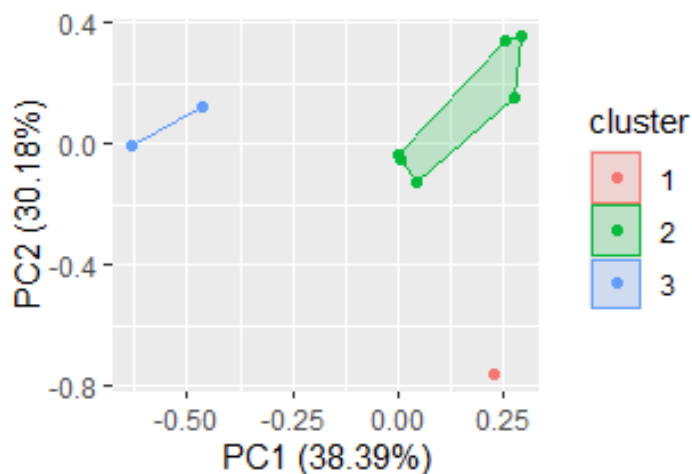
también el encontrar ganaderías con las características definidas en el estudio (ordeño manual, sistema estabulado y con alimentación del ganado lechero con ensilado) conllevó a encontrar ganaderías distantes entre ellas.

5.2.2 Análisis de clusterización

A partir de los datos obtenidos se formaron tres clústers, los cuales se representan gráficamente de la siguiente forma:

Figura 4

Clústers encontrados en el análisis



Utilizando el programa R (versión 4.1.3), se llevaron a cabo análisis de clústers para agrupar las ganaderías según los resultados de las muestras de *E. coli* que mostraron valores destacados en comparación con el resto. A continuación, se presenta la conformación de los clústers y su análisis:

Clúster 1: Ganadería 9 se distingue por el mayor crecimiento de *E. coli* en la muestra de leche analizada, destacándose significativamente respecto a otras ganaderías. Una característica de este clúster es que en las muestras tomadas

en dicha ganadería solamente presentó crecimiento de *E. coli*, en la muestra de leche; lo que pudiera indicar una contaminación puntual, para lo cual se debe realizar una inspección en el área de almacenamiento de la leche y poder corregir alguna deficiencia (ver anexo U).

Clúster 2: Ganadería 2, Ganadería 4, Ganadería 5, Ganadería 6, Ganadería 7 y Ganadería 8 muestran variaciones en los resultados de crecimiento de *E. coli*, sin formar un patrón claro que permita agruparlas en un clúster diferenciado (ver anexos N, P, Q y S). La identificación de contaminación por *E. coli* en diferentes muestras en las ganaderías, requiere que se implementen un programa de buenas prácticas de ordeño, así como identificar las posibles fuentes de contaminación y tomar las medidas necesarias para eliminarlas.

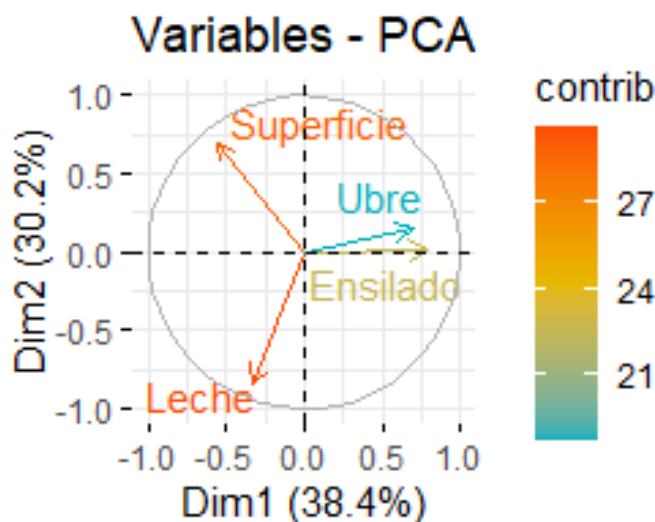
Clúster 3: Ganadería 1 y Ganadería 3 se agruparon debido al notable crecimiento de *E. coli* en sus muestras, valores que son significativos en comparación con el resto de las muestras y ganaderías: 2000 UFC/mL en muestra de ensilado y 1600 UFC/mL en muestra de hisopado de ubre. Este clúster se caracteriza por presentar los valores más altos de *E. coli*, en estas ganaderías se debe realizar una inspección para identificar la fuente de contaminación y tomar las medidas necesarias para la eliminación de estas.

5.2.3 Análisis de componentes principales

Se llevó a cabo un análisis de componentes principales para explorar la variabilidad de los datos en relación con las variables de estudio, con el fin de determinar posibles relaciones directas entre ellas. Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 5.

Figura 5

Relación entre las distintas variables estudiadas dentro de los componentes principales



Según la representación gráfica del análisis de componentes principales, en la dimensión Dim1 se observa que refleja el 38.4% de la variabilidad de los datos, indicando la relación entre las variables de estudio. En la figura, se puede notar que el ensilado y la ubre están alineados en la misma dirección y muy próximos entre sí. Esto sugiere la posibilidad de una fuente común de contaminación, la cual puede ser el estiércol de ganado, debido al mal manejo y disposición final del mismo; así como la falta de limpieza del área de ordeño y la deficiente limpieza de ubres y pezones. Además, durante las visitas a las diferentes ganaderías, se observó que los lugares de elaboración y almacenamiento del ensilado están abiertos y accesibles al ganado, el cual pasta brevemente antes de ser confinado en corrales. Esta situación facilita la contaminación del ensilado con *E. coli* a través de las heces del ganado (ver anexo J).

Asimismo, las ubres del ganado pueden contaminarse, especialmente en los corrales que carecen de un adecuado sistema de drenaje y presentan deficiencias en la limpieza. Es importante considerar que los bovinos son reservorios primarios de *E. coli*. Según Narvaez-Bravo, 2017 en su estudio sobre el "Aislamiento de *Escherichia coli* en muestras de heces de ganado bovino de doble propósito", encontró aislamientos de 6 cepas de *E. coli*, lo que representó el 1.94% de muestras positivas. Aunque todo el ganado estaba asintomático, el estiércol del ganado podría ser una fuente potencial de contaminación tanto para el ensilado como para las ubres.

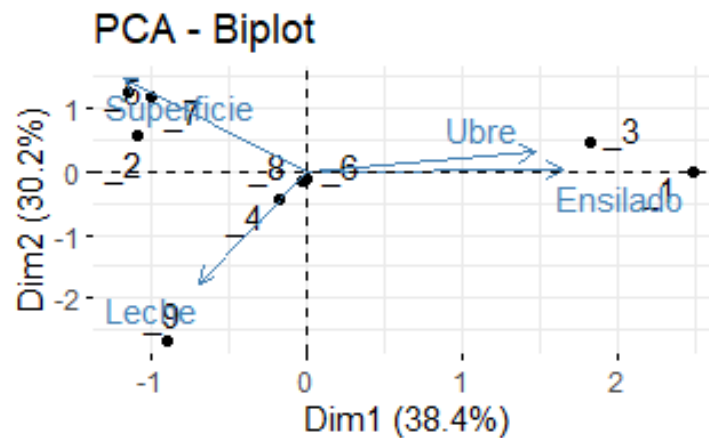
En relación con la Dim2, esta dimensiona la variabilidad de los datos en un 30.2%. Al observar el gráfico, se nota que la variable superficie y leche están en la misma dimensión, pero en direcciones opuestas, lo cual sugiere que no hay una relación directa entre estas variables. Lo anterior se puede deber a que existen otras condiciones que pueden estar influyendo en la contaminación por *E. coli* en estas variables; como puede ser, la contaminación de las superficies donde se recolecta la leche, ésta podría estar relacionada con prácticas inadecuadas de lavado y almacenamiento de los recipientes, ya que una deficiente limpieza puede favorecer el crecimiento bacteriano en las superficies de los utensilios por las condiciones de humedad y temperatura, más aún si quedan con residuos de leche que pueden ser un ambiente propicio para la reproducción de bacterias.

Es importante considerar que el agua utilizada para la limpieza en las instalaciones de las ganaderías proviene principalmente de pozos u otros reservorios de agua superficial, los cuales no reciben tratamiento de desinfección previo. Esta falta de agua segura para la limpieza y desinfección de los recipientes utilizados en la recolección de la leche podría propiciar el crecimiento de microorganismos. Además, los recipientes se mantienen al aire

libre sin medidas de protección adicionales, lo que puede contribuir aún más a la contaminación. Por esa razón, se había considerado analizar muestras de agua para consumo en los animales, para determinar la presencia de *Salmonella* spp y *E. coli*; sin embargo, debido a la metodología realizada con Petrifilm en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Ministerio de Agricultura y Ganadería, los resultados obtenidos no son válidos ya que el Reglamento Técnico Salvadoreño de agua de consumo humano está basada en la guía de la calidad del agua de la Organización Mundial de la Salud, donde no coincide la cantidad de muestra analizada con la que establece el RTS, por eso se consideró no incluir los resultados obtenidos (ver anexos K y L).

Figura 6

Biplot de las variables estudiadas y las ganaderías monitoreada



En la figura 4 se observan las ganaderías que muestran una relación cercana en cuanto al crecimiento de UFC/mL de *E. coli* en las variables de estudio. La Ganadería 1 destaca por presentar un alto crecimiento de *E. coli* en ensilado, con 2000 UFC/mL. La Ganadería 3 muestra un notable crecimiento de *E. coli* en ubre, con 1600 UFC/mL. Las ganaderías 2, 5 y 7 registran valores de *E. coli* en

superficie entre 240 y 290 UFC/mL. La Ganadería 9 exhibe el mayor crecimiento de *E. coli* en leche, con 120 UFC/mL. Las Ganaderías 4 y 6 se sitúan cerca del vértice, con valores de crecimiento de *E. coli* en las diversas muestras entre 10 y 45 UFC/mL, sin clasificarse en una variable de estudio específica. Por último, la Ganadería 8 se encuentra en el vértice debido a que los resultados reflejados son <10 UFC/mL para todas las variables de estudio. Esta figura es de utilidad para poder identificar las variables que se relacionan más entre ganaderías y la similitud de las mismas, lo cual nos ayuda a la toma de decisiones para poder establecer las posibles fuentes de contaminación y tomar las medidas correctivas y así disminuir la probabilidad de contaminación de la leche, y evitar el riesgo de adquirir enfermedades gastrointestinales.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

Conclusiones

- Las variables independientes (ensilado, ubre y superficie) y la variable dependiente (leche) no reflejan una relación significativa en términos de la contaminación por *E. coli*. Por lo que otros factores pueden estar influyendo en la contaminación de la leche, los cuales pueden considerarse en estudios futuros.
- La contaminación del ensilado por *E. coli*, puede estar relacionado a una contaminación por estiércol del ganado, ya que se encuentran pastoreando en los lugares donde tienen almacenado el ensilado. De acuerdo con estudios consultados el principal reservorio de *E. coli*, es el ganado y se ha detectado la presencia en el estiércol.
- Las inadecuadas prácticas de la limpieza y desinfección de las instalaciones, ubres y equipo de ordeño, contribuye a la carga de *E. coli* en las ubres del hato lechero.
- La falta de implementación de programas de limpieza de utensilios, así como de las instalaciones puede aportar al crecimiento de *E. coli* en la superficie de los recipientes donde se colecta la leche, sumado a que no cuentan con agua segura para realizar este procedimiento.
- La determinación de *Salmonella* spp en las variables de estudio, no refleja una contaminación por este microorganismo, a pesar de que en las ganaderías se encontraban aves de corral. No se puede confirmar la presencia de *Salmonella* spp porque no se analizaron otras variables en el presente estudio.

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES

Recomendaciones

- Las ganaderías deben implementar buenas prácticas de ordeño, con el objetivo de disminuir el riesgo de contaminación por microorganismos patógenos.
- Contar con agua segura para el uso dentro de la ganadería, que haya pasado por un sistema de desinfección, para evitar que el agua utilizada, sea la fuente de contaminación de la leche.
- Implementar programas de limpieza y desinfección eficientes en todas las áreas de las ganaderías, principalmente en el área de ordeño.
- Los recipientes y equipos que se utilizan para la recolección de la leche deben desinfectarse previamente y resguardarse en un lugar seguro.
- Garantizar una buena fermentación del ensilado, así como evitar dejarlo descubierto a la intemperie ya que es susceptible a contaminación por la defecación de animales y crecimiento de microorganismos patógenos.
- Brindar capacitaciones al personal que realiza las prácticas de ordeño, con el objetivo de actualizarse con las nuevas tecnologías.
- El personal a cargo del ordeño debe realizarse periódicamente exámenes clínicos, para evitar que sean portadores de alguna enfermedad y pueda ser transmitida a la leche.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

- Administración de Alimentos y Medicamentos. (2018). *Los peligros de la leche cruda: La Leche sin pasteurizar puede representar un riesgo grave para la salud*. <https://www.fda.gov/es/node/390100>
- Aguilera Becerra, A.M., Urbano Cáceres, E. X. y Jaimes Bernal, C.P. (2014). *Pathogenic bacteria in raw milk: a public health and food safety problem*. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5191851.pdf>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). An Atlas of Salmonella in the United States, 1968– 2011: Laboratory-based enteric disease surveillance. U.S. Department of Health and Human Services. <https://www.cdc.gov/salmonella>
- Fuentes-Coto, G., Ruiz-Romero, R. A., Sánchez Gómez, J. I., Ávila-Ramírez, D. N., & Escutia-Sánchez, J. (2023). *Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: Atributos deseables para su transformación*. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 10(4), 419. <https://doi.org/10.22231/asyd.v10i4.134>
- Gaviria, B. C. (2007). *Calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda*. Fondo Editorial, Laboratorio Biogénesis. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/download/328079/20785048/>
- Herrera, C. (2019) *Síndrome Diarreico* [seminario Web]. Universidad San Sebastián. http://www.saludinfantil.org/Seminarios_Pediatria/Gastroenterologia/Sindrome_Diarreico.pdf
- Jiménez Manso, A., Babich J., Sánchez Moreno, M. P. y Fernández Valenti, M. L. (2022). Ensayos microbiológicos en alimentos en brotes de transmisión alimentaria. Procedimiento de Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.

<https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento78.pdf>

- Junod, T., López-Martin, J., & Gadicke, P. (2013) *Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de Salmonella enterica* en muestras de origen animal y alimentario. *Revista Médica de Chile*, 141(3), 1, <https://www.scielo.cl/pdf/rmc/v141n3/art03.pdf>
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., & Mobley, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. En: *Nat Rev Micro*. 2004. Vol. 2, N° 2, p. 123-140.
- Ksenija, N., Radmila, Mitrovic y Radmila Markovic. (2021). *Categorization of animal feed accorgind to microbiological quality-preferable improvement in the food chain, purpose_ledpublishing.volumen854* 1-7. <https://iopescience.ioporg/article/10.1088/1755-1315/854/1/012065>
- Lynn, T. V., Hancock, D. D., Besser, T. E., Harrison, J. H., Rice, D. H., Stewart, N.T. & Rowan, L. L. (1998). The occurrence and replication of *Escherichia coli* in cattle feeds. *Journal of Dairy Science*, 81, 1102–1108. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75672-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75672-3)
- Moreno Vásquez, F. C., Rodríguez Martínez, G., Méndez Mancera, V. M., Osuna Ávila, L. E. & Vargas, M. R. (2007). *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)*. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-503649>
- Narváez Bravo, C., Carruyo Núñez, G., Moreno, M., Rodas González, A., Hoet, A., & Wittum, T. (2017). Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del Municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 27(1), 1. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/15281>
- Norma Salvadoreña Obligatoria 67.01.01:06. (1993). *Comité Técnico de Normalización del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*,

CONACYT.

https://www.oirsa.org/contenido/2017/EI_Salvador_INOCUIDAD/19.%20NSO%2067%2001%2001%2006%20LECHE%20CRUDA%20DE%20VACA%20Y%20ESPECIFICACIONES%20%20PRIMERA%20ACTUALIZACION.pdf

Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. (OIRSA, 2018).

Manual de introducción a la inocuidad.

<https://www.oirsa.org/contenido/2019/Manual%20de%20Introduccion%20a%20la%20Inocuidad%20de%20los%20alimentos%20-%20OIRSA.pdf>

Organismo Mundial de la Sanidad Animal. (OMSA, 2018). *Manual Terrestre.*

Capítulo 3.9.8.

Salmonelosis. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.09.08_SALMONELLOSIS.pdf

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

(FAO, 2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria,*

<https://www.fao.org/3/i0480s/i0480s.pdf>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Prevención de la E. coli en los alimentos. Estados Unidos. (FAO; 2011).

https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf

Organización Mundial de La Salud. (OMS, s.f.). *Enfermedades de Transmisión*

Alimentaria. https://www.who.int/es/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_3

Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud.

(OPS/OMS, s.f.). *Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).*

https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0

Queiroz, O. C., Ogunade, I. M., Weiberg, Z. y Adesogans, A. T. (2018) *Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives*.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021830331X>

The Center for Food Security and Public Health. 2009. *E. coli enterohemorrágica*. Iowa State University. Iowa, USA

USAID, (s.f.). *Buenas Prácticas de Ordeño (BPO)*. Programa de Alianzas Comerciales.

<https://files.rcnradio.com/2020->

[11/Buenas%20Pra%CC%81cticas%20de%20Orden%C%83o.pdf](https://files.rcnradio.com/2020-11/Buenas%20Pra%CC%81cticas%20de%20Orden%C%83o.pdf)

GLOSARIO

Glosario

Aeróbico: Una bacteria aeróbica que requiere de oxígeno para crecer y sobrevivir.

Agente etiológico: Organismo biológico (virus, bacteria, hongo o parásito) capaz de producir enfermedad ya sea directa o a través de sus toxinas.

Anaeróbico: Una bacteria anaeróbica es un microorganismo que es capaz de sobrevivir y multiplicarse en ambientes que no tienen oxígeno.

Buenas Prácticas de Ordeño: Es la ejecución de actividades que cumplen los requisitos mínimos para obtener leche apta para el consumo humano y luego procesarla adecuadamente al elaborar productos lácteos.

Células somáticas: Células del cuerpo animal, presentes a bajos niveles en la leche normal.

Coliformes: Las bacterias coliformes constituyen un conjunto de especies bacterianas que comparten mismas características bioquímicas en común y de importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y alimentos.

Ensilado: Es el alimento para el ganado que se obtiene de los forrajes húmedos, conservados en silos y transformados por fermentación láctica.

Enfermedad Transmitida por los Alimentos: Enfermedades provocadas por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos o parásitos.

Inocuidad: Es la característica que garantiza que los alimentos no producen daño a la salud.

Intoxicación: Es el efecto perjudicial que se produce cuando una sustancia tóxica se ingiere, inhala o entra en contacto con algún organismo.

Leche cruda: Es la leche de la vaca que no ha sido pasteurizada para eliminar las bacterias dañinas.

Mastitis: Consiste en la inflamación de las glándulas mamarias o ubre en las vacas, ocasionando disminución de la producción y en la calidad de la leche.

Microorganismo: Es un ser vivo muy pequeño que sólo se pueden ver a través de un microscopio.

Ordeño: Es el procedimiento de extraer la leche de las glándulas mamarias, llamadas ubre. Puede realizarse de forma manual o mecánica.

Patógeno: Es un microorganismo capaz de producir alguna enfermedad o daño en un huésped, sea animal o vegetal.

Salmonelosis: Es una enfermedad bacteriana común que afecta el tubo intestinal y producida por *Salmonella*.

Saprófitas: Son organismos que obtienen alimento disuelto a partir de los cuerpos muertos o en descomposición de otros organismos.

Toxina: Es una sustancia venenosa de origen microbiano que mata células y altera el crecimiento o desarrollo del organismo.

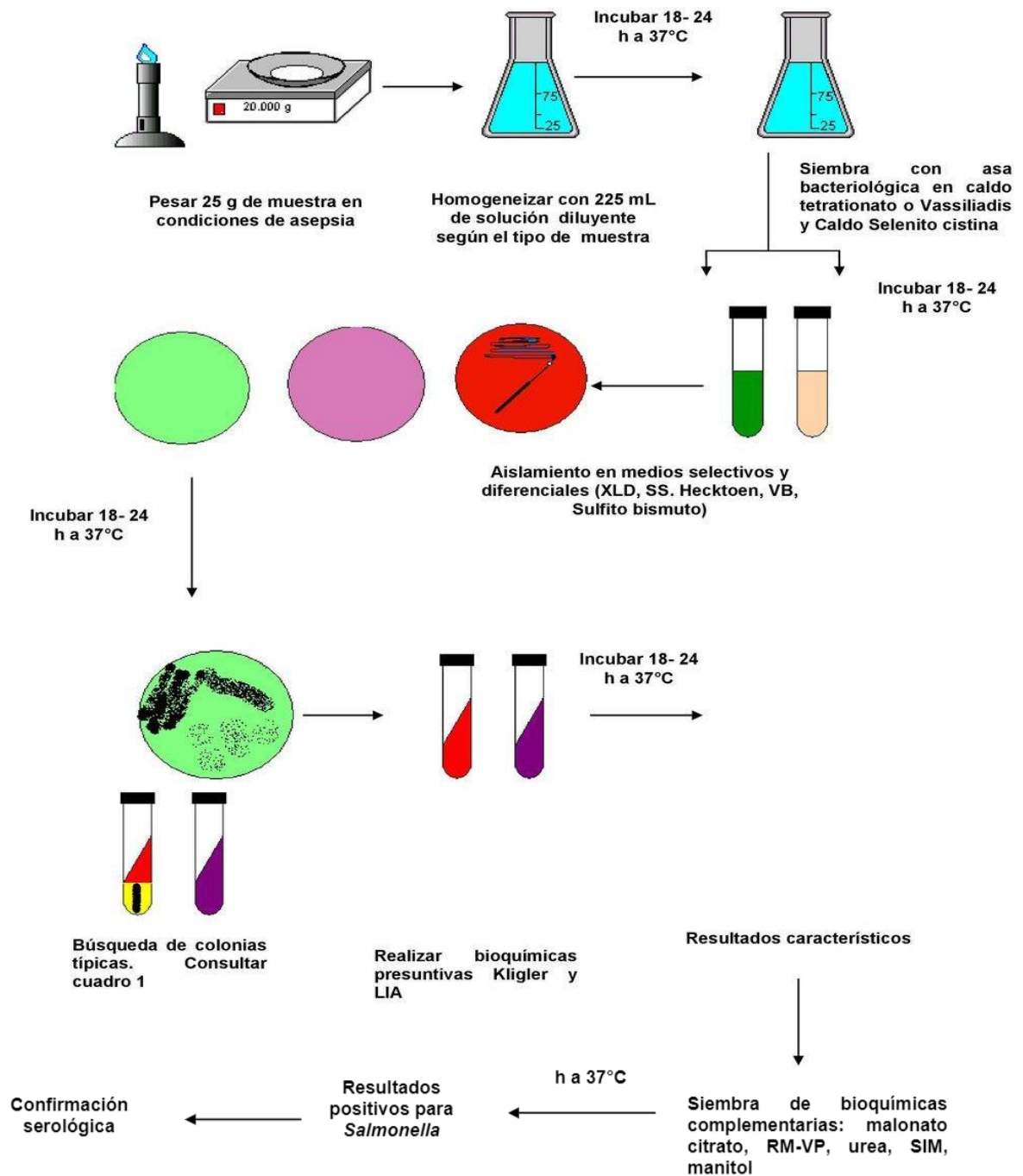
Ubre: Es el órgano mamario de las vacas y está ubicado en el área inguinal.

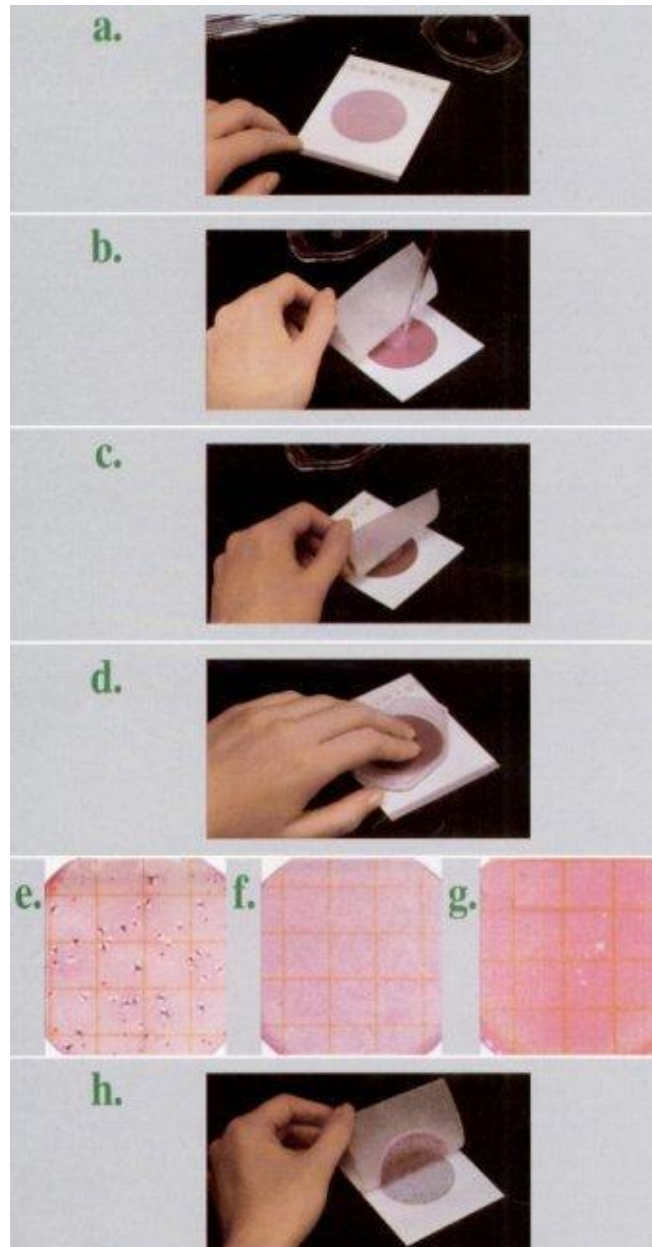
Zoonosis: Es cualquier enfermedad o infección que es naturalmente transmisible desde animales vertebrados al hombre.

ANEXOS

Anexo A

Determinación de *Salmonella* spp en muestras de alimentos y superficies



Anexo B*Determinación de E. coli por recuento en placa Petrifilm*

Anexo C

Ficha de toma de muestra de cada ganadería



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA E
INOCUIDAD
DE ALIMENTOS



“IDENTIFICACIÓN DE ESCHERICHIA COLI Y SALMONELLA SPP. EN
LECHE CRUDA Y SU RELACIÓN CON EL ENSILADO COMO
FUENTE DE CONTAMINACIÓN EN DIFERENTES REGIONES DE EL
SALVADOR”.

Número de ganadería:

Nombre de ganadería:

Ubicación geográfica:

Manual

Tipo de ordeño:

Mecánico

Tipo de alimentación:

Potable

Origen del agua:

Pozo u otro

¿Alimenta con ensilado?

Tipo de ensilado:

¿Realiza Buenas Prácticas de
Ordeño?

Toma de muestras

Código de muestra:

Leche cruda

Fecha de la toma:

	Hora de la toma:
	Código de muestra:
Ensilado	Fecha de la toma:
	Hora de la toma:
	Código de muestra:
Agua	Fecha de la toma:
	Hora de la toma:
	Código de muestra:
Hisopado de recipiente	Fecha de la toma:
	Hora de la toma:
	Código de muestra:
Hisopado de ubre	Fecha de la toma:
	Hora de la toma:
Fecha de envío al laboratorio	

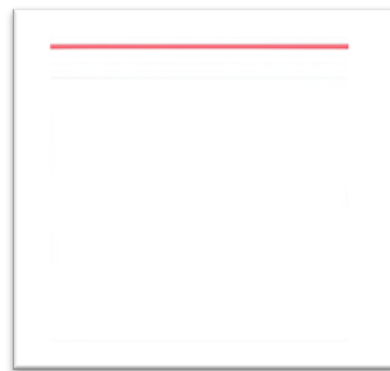
Anexo D

Ficha para toma de muestra de leche

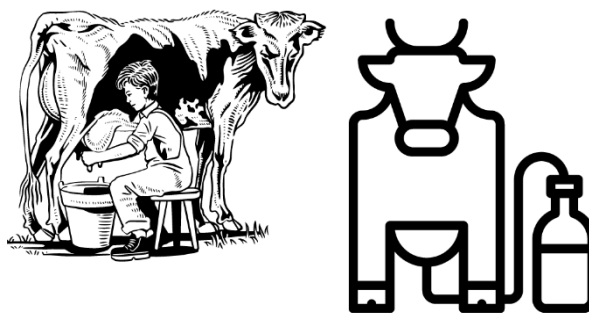
Materiales: Bolsas plásticas con cierre hermético
Hielera (a temperatura de 4°C)
Lápiz permanente

Rotular muestra: Código
Nombre
Fecha y hora de recolecta

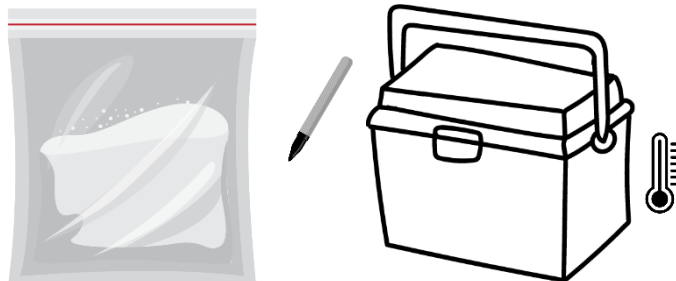
1. En una bolsa plástica con cierre hermético:



2. Recolectar 200 ml de leche:



3. Rotular y transportar en hielera al laboratorio:



Anexo E

Ficha para toma de muestra de ensilado

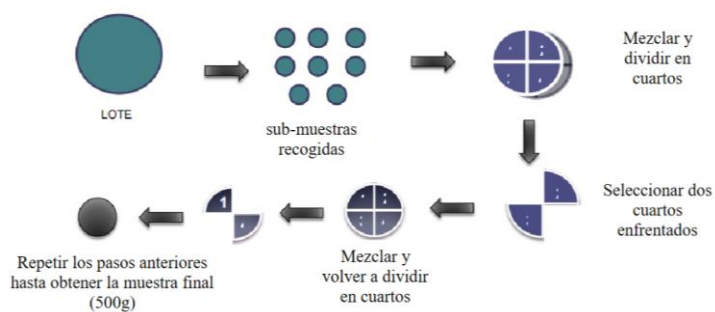
Materiales: Bolsas plásticas con cierre hermético
 Hielera (a temperatura de 4°C)
 Lápiz permanente

Rotular muestra: Código
 Nombre
 Fecha y hora de recolecta

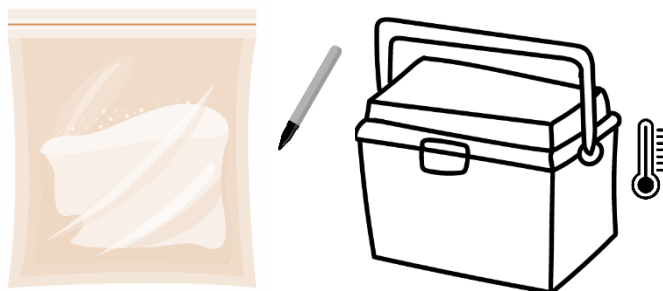
1. En una bolsa plástica con cierre hermético:



2. Recolectar 500 g de ensilado:



3. Rotular y transportar en hielera al laboratorio:



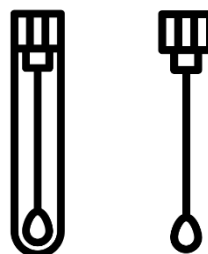
Anexo F

Ficha para toma de muestra de hisopado en superficie viva

Materiales: Pur-blue swab, HiCap Caldo Neutralizante
Hielera (a temperatura de 4°C)
Lápiz permanente

Rotular muestra: Código
Nombre
Fecha y hora de recolecta

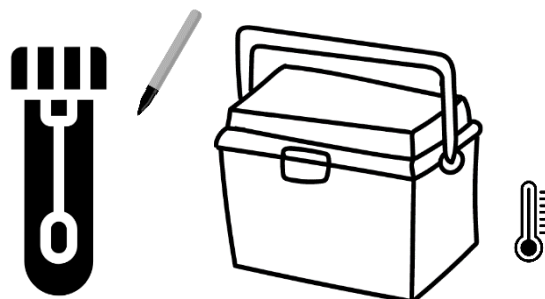
1. En un tubo Pur-blue swab, HiCap Caldo Neutralizante:



2. Tomar muestra de hisopado en ubres:



3. Rotular y transportar en hielera al laboratorio:



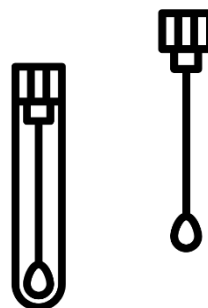
Anexo G

Ficha para toma de muestra de hisopado en superficie inerte

Materiales: Pur-blue swab, HiCap Caldo Neutralizante
Hielera (a temperatura de 4°C)
Lápiz permanente

Rotular muestra: Código
Nombre
Fecha y hora de recolecta

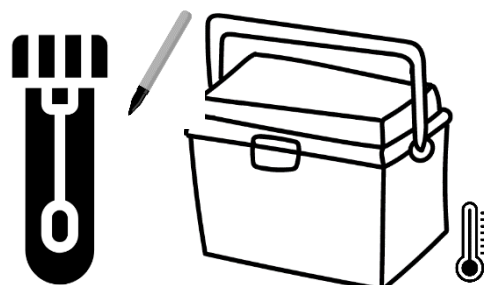
1. En un tubo Pur-blue swab, HiCap Caldo Neutralizante:



2. Tomar muestra de hisopado en recipientes:



3. Rotular y transportar en hielera al laboratorio:



Anexo H

Ficha técnica de hisopos PUR-blue



1. DESCRIPCIÓN:



A diferencia de los hisopos con punta de fibra tradicionales, los hisopos PUR-Blue utilizan puntas de espuma de poliuretano de grado médico que resisten el desgarro y el deshilachado, lo que lo convierte en una mejor opción para tomar muestras de superficies rugosas. Fabricado según estándares rigurosos consistentes, el poliuretano no es tóxico y está libre de biocidas, lo que mejora en gran medida la recuperación y liberación de los microorganismos recolectados, sin ningún componente que pueda interferir con los métodos de prueba posteriores. Los hisopos PUR-Blue contienen tampón neutralizante para neutralizar los desinfectantes residuales en las superficies de los productos alimenticios. Al neutralizar los desinfectantes residuales en la superficie de la muestra y mantener la viabilidad de los microorganismos recolectados por hasta 72 horas, los hisopos PUR-Blue ayudan a prevenir resultados falsos negativos y cuantifican con precisión los microorganismos.

PUR-Blue™ Swab Samplers está diseñado para ayudar al usuario a fregar vigorosamente una superficie para perturbar y biofilm ascensor a colección optimice de microorganismos. A diferencia del algodón tradicional con fibra o los hisopos con punta Dacron, PUR-Blue utiliza un hisopo con punta de espuma de poliuretano de alta tecnología que permite un muestreo fácil de áreas muy pequeñas y grandes (hasta 1 pie²). La punta de espuma resiste rasgaduras y deshilachados, lo que la hace mejor para muestrear superficies rugosas. El eje más grueso permite al usuario presionar el hisopo firmemente sobre la superficie durante el muestreo. Úselo con un poste de extensión para muestrear áreas difíciles de alcanzar, lo que lo convierte en un dispositivo de muestreo universal altamente adaptable.

2. COMPOSICIÓN:

- Tubo plástico con tapa y swab con punta de espuma de poliuretano de grado médico.
- Múltiples opciones de medios neutralizantes
- Pruebas Cuantitativas (Caldo Neutralizante HiCap/ DE), Caldo Lethen 1.5 ml
- Pruebas Cualitativas (Caldo Neutralizante HiCap/,Caldo Lethen, Tampón neutralizante) 4, 5 o 10 ml
- Gamma irradiado

3. PRESENTACIÓN COMERCIAL:

El Kit PUR-Blue Swab Sample contiene los reactivos y materiales necesarios para 100 test por kit.



4. PERIODO DE VIDA ÚTIL:

El Kit PUR-Blue Swab Sample tiene un periodo de vida útil de 8 meses.

5. CAMPO DE USO:

Los datos obtenidos del Kit PUR-Blue Swab Sample no deben usarse con fines de diagnóstico o tratamiento humano. El equipo no está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos ni por ninguna otra agencia reguladora de EE. UU. O no estadounidense para su uso en diagnósticos o tratamientos humanos. El sistema Kit PUR-Blue Swab Sample no debe usarse como la única base para evaluar la seguridad de los productos para su liberación a los consumidores. La información generada solo se debe utilizar junto con el programa regular de garantía de calidad del usuario. No aprobado para diagnóstico clínico. Uso para investigación y desarrollo, garantía de calidad y control de calidad bajo supervisión de personas técnicamente calificadas.

6. ALMACENAMIENTO Y MANEJO:

- Manejar de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio
- No coma, beba ni fume cuando use este producto.
- Evitar el contacto con la piel y los ojos.
- Las botellas de lavado de ojos deben estar disponibles
- Lávese las manos después de usar este producto.
- Mantenga los dispositivos de muestreo individuales sellados en una bolsa con cierre hermético. Almacene las cajas en un ambiente seco a temperaturas ambiente.

7. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD:

Reactividad: No hay información disponible.

Estabilidad química: se considera estable en condiciones normales

Posibilidad de reacciones peligrosas: no se conocen reacciones peligrosas si se utiliza para lo previsto propósito

Condiciones a evitar: No hay más información relevante disponible

Materiales incompatibles: No hay información disponible.

Productos de descomposición peligrosos: Quema de plástico (espuma de poliuretano y polipropileno) dará lugar a humos tóxicos y humo. Los productos de descomposición pueden incluir carbono y óxidos de nitrógeno, así como pequeñas cantidades de cianuro (CN-) de la quema de poliuretano espuma y trazas de acroleína, formaldehído y vapores orgánicos provenientes de la quema de polipropileno.

8. PROCEDIMIENTO:

1. Etiquetar el tubo.
2. Desenrosque la tapa del tubo de hisopo. Presione cada lado de la punta del hisopo contra el interior del tubo para eliminar los medios de exceso.
3. Presione firmemente contra la superficie para asegurarse de que la punta del hisopo haga contacto completo con la superficie de la muestra.



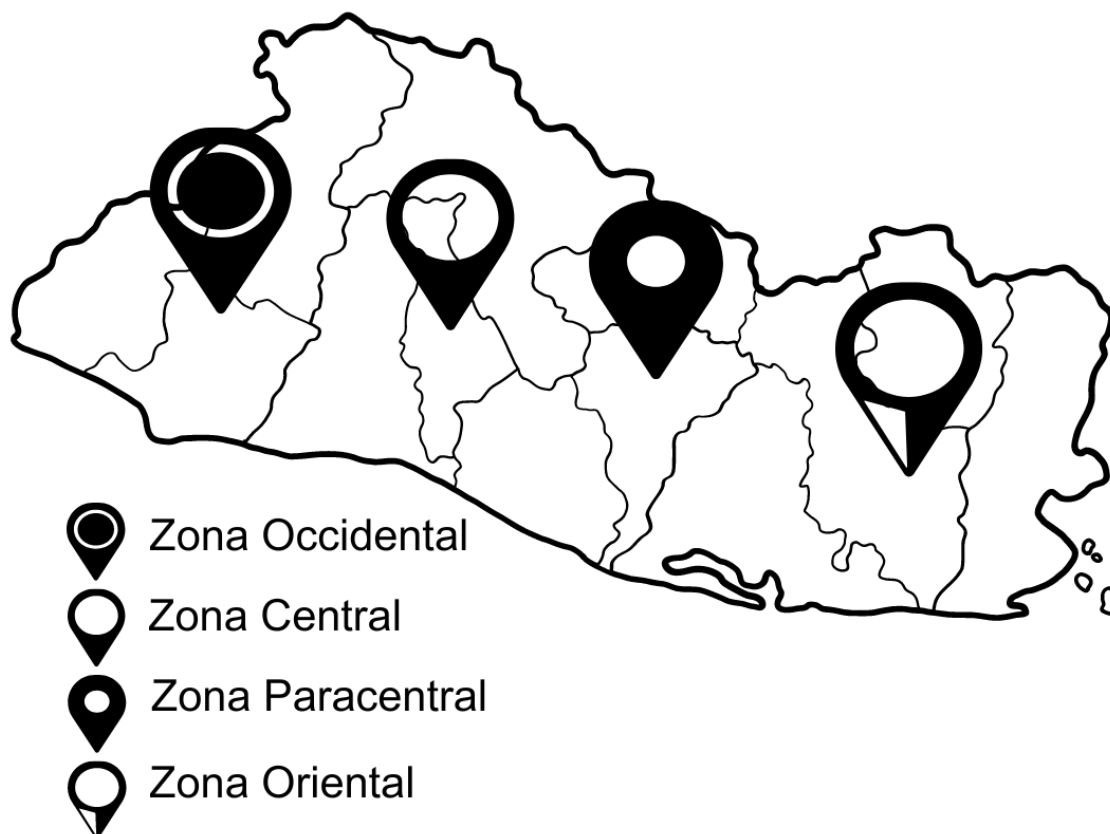
4. Frote vigorosamente hacia adelante y hacia atrás sobre la superficie, mientras gira el hisopo para asegurarse de que toda la punta del hisopo haga contacto con la superficie
5. Cambie la dirección 90 ° y repita el proceso
6. Vuelva a colocar el hisopo en el tubo y apriete la tapa. Enviar al laboratorio para su análisis.

9. DISPOSICIÓN:

La eliminación debe realizarse de acuerdo con los estatutos locales, estatales o nacionales. El dispositivo en sí no es biopeligroso. Se pueden obtener altos niveles de microorganismos con incubación del dispositivo y / o si se agregan soluciones nutritivas adicionales al dispositivo seguido de incubación. Si este es el caso, siga las buenas prácticas de laboratorio para descontaminación antes de su eliminación. Consulte al fabricante para obtener información sobre el reciclaje.

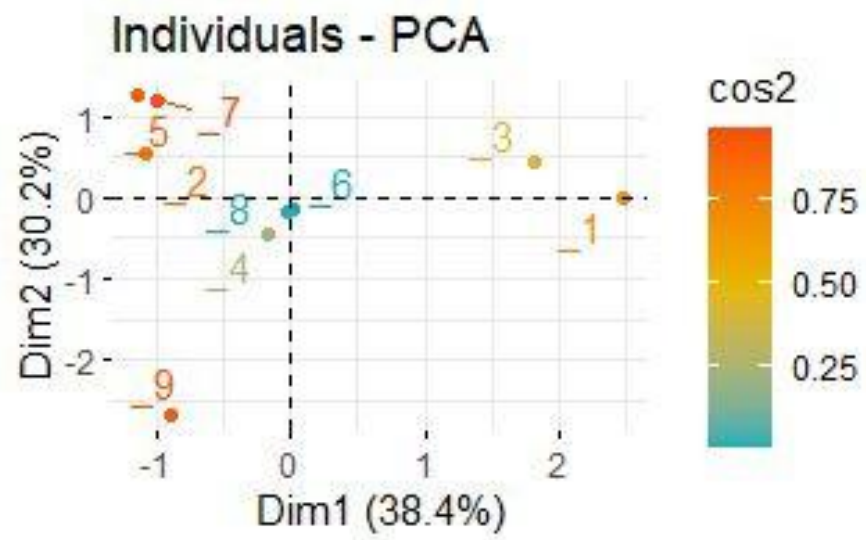
Anexo I

Zonas geográficas de El Salvador



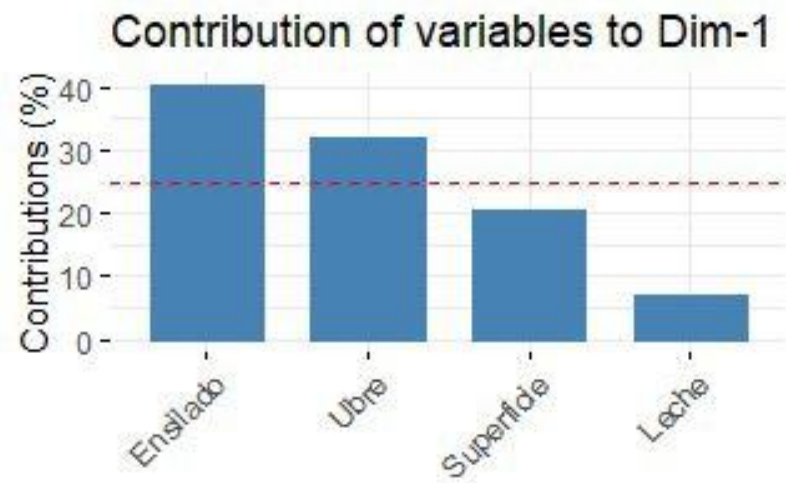
Anexo J

Análisis de componentes principales por ganadería



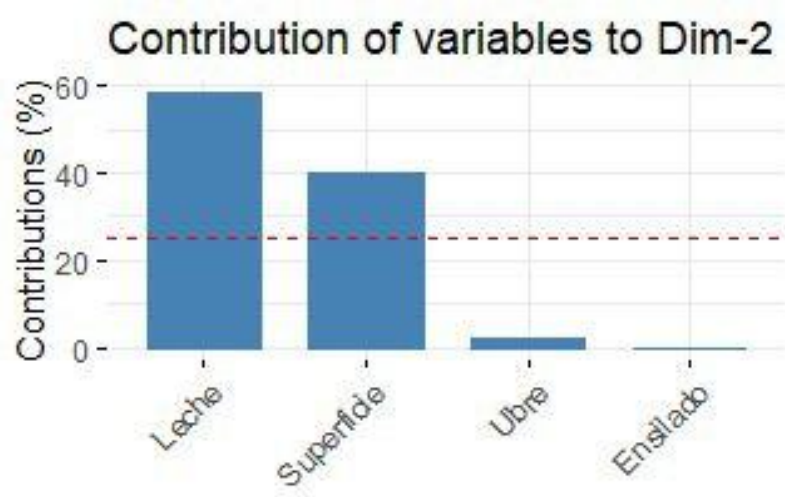
Anexo K

Contribución de las variables en la dimensión 1 del análisis de componentes principales



Anexo L

Contribución de las variables en la dimensión 2 del análisis de componentes principales



Anexo M

Resultados de ganadería 1, región paracentral

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp
Ensilado	2000 UFC/g	Ausencia
Leche cruda	<10 UFC/mL	Ausencia
Ubre	420 UFC/mL	Ausencia
Superficie	<10 UFC/mL	Ausencia

Nota. En resultados obtenidos se identificó crecimiento de *E. coli* en el ensilado, el agua y ubre del ganado. No presentó crecimiento de *E. coli* en la leche y en superficie de los recipientes de recolección de la leche. En la ganadería no se encontró presencia de *Salmonella* spp.

Anexo N

Resultados de ganadería 2, región paracentral

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp</i>
Ensilado	<10 UFC/g	Ausencia
Leche cruda	30 UFC/mL	Ausencia
Ubre	35 UFC/mL	Ausencia
Superficie	240 UFC/mL	Ausencia

Nota: En los resultados se identificó crecimiento de *E. coli*, en la leche, agua, ubre y superficie. No encontrando crecimiento de *E. coli* en el ensilado, no identificando crecimiento de *Salmonella spp* en ninguna de las muestras.

Anexo O

Resultados de ganadería 3, región paracentral

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp
Ensilado	280 UFC/g	Ausencia
Leche cruda	10 UFC/mL	Ausencia
Ubre	1600 UFC/mL	Ausencia
Superficie	26 UFC/mL	Ausencia

Nota: En los resultados se identificó crecimiento de *E. coli*, en la leche, agua, ubre y superficie. No encontrando crecimiento de *E. coli* en el ensilado, no identificando crecimiento de *Salmonella* spp en ninguna de las muestras.

Anexo P

Resultados de ganadería 4, región central

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp
Ensilado	<10 UFC/g	Ausencia
Leche cruda	20 UFC/mL	Ausencia
Ubre	10 UFC/mL	Ausencia
Superficie	15 UFC/mL	Ausencia

Nota: En los resultados obtenidos de la Ganadería 4, se identificó el crecimiento de *E. coli*, en la leche, ubre y superficie, no así en el ensilado y el agua, además hubo presencia de *Salmonella* spp en la muestra de agua.

Anexo Q

Resultados de ganadería 5, región central

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp
Ensilado	<10 UFC/g	Ausencia
Leche cruda	10 UFC/mL	Ausencia
Ubre	45 UFC/mL	Ausencia
Superficie	290 UFC/mL	Ausencia

Nota: En los resultados de las muestras analizadas de la ganadería, hubo crecimiento de *E. coli* en la muestra de leche, agua, ubre y superficie, no así en la muestra de ensilado, en cuanto al crecimiento de *Salmonella* spp se identificó presencia solamente en la muestra de agua.

Anexo R

Resultados de ganadería 6, región central

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp
Ensilado	10 UFC/g	Ausencia
Leche cruda	<10 UFC/mL	Ausencia
Ubre	45 UFC/mL	Ausencia
Superficie	10 UFC/mL	Ausencia

Nota: Se identificó crecimiento de *E. coli* en las muestras de ensilado, ubre y superficie, no así en la leche y el agua, en ninguna de las muestras hubo presencia de *Salmonella* spp.

Anexo S

Resultados de ganadería 7, región occidental

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp
Ensilado	<10 UFC/g	Ausencia
Leche cruda	<10 UFC/mL	Ausencia
Ubre	<10 UFC/mL	Ausencia
Superficie	260 UFC/mL	Ausencia

Nota: En los resultados se identificó crecimiento de *E. coli*, solamente en la muestra de superficie, no así en el resto de las muestras tomadas, no se observó crecimiento de *Salmonella* spp.

Anexo T*Resultados de ganadería 8, región occidental*

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp
Ensilado	<10 UFC/g	Ausencia
Leche cruda	<10 UFC/mL	Ausencia
Ubre	<10 UFC/mL	Ausencia
Superficie	<10 UFC/mL	Ausencia

Nota: En los resultados obtenidos de las muestras de esta ganadería no se identificó crecimiento de *E. coli*, ni de *Salmonella* spp.

Anexo U

Resultados de ganadería 9, región occidental

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp
Ensilado	<10 UFC/g	Ausencia
Leche cruda	120 UFC/mL	Ausencia
Ubre	<10 UFC/mL	Ausencia
Superficie	<10 UFC/mL	Ausencia

Nota: En los resultados de la ganadería, se identificó crecimiento de *E. coli*, en las muestras de leche y agua, no así en las muestras de ensilado, ubre y superficie, ninguna muestra se identificó presencia de *Salmonella* spp.

IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli* Y *Salmonella spp* EN LECHE CRUDA Y SU RELACIÓN CON EL ENSILADO COMO FUENTE DE CONTAMINACIÓN EN DIFERENTES REGIONES DE EL SALVADOR

IDENTIFICATION OF *Escherichia coli* AND *Salmonella spp* IN RAW MILK AND ITS RELATIONSHIP WITH SILAGE AS A SOURCE OF CONTAMINATION IN DIFFERENT REGIONS OF EL SALVADOR

Doris Yamileth Abrego Soriano¹, Rooney Advenia Sáenz de Cuéllar

(1) Máster en Microbiología e Inocuidad de Alimentos. dorisabrego9312@gmail.com

(2) Máster en Microbiología e Inocuidad de Alimentos. advesaenz@gmail.com

Diciembre 2024

RESUMEN

Para la identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, en leche cruda y su relación con el ensilado como fuente de contaminación en diferentes regiones de El Salvador; se estudiaron 9 ganaderías en total, 3 ganaderías de la región occidental, 3 ganaderías de la región central y 3 ganaderías de la región paracentral; en cada ganadería se tomaron muestras de leche cruda, ensilado, superficie viva (ubre), superficie inerte (recipiente), las muestras se trasladaron al Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Ministerio de Agricultura y Ganadería, para la determinación de *E. coli* y *Salmonella spp*. Los resultados obtenidos en el laboratorio reflejaron que se identificó *E. coli*, en 3 muestras de ensilado, en 5 muestras de leche cruda, en 6 muestras de ubre y en 6 muestras de superficies. En cuanto a la detección de *Salmonella spp*, en ninguna muestra hubo crecimiento.

La presentación y análisis de los datos se realiza utilizando el programa R (versión 4.2.1), se realizó regresión lineal con los

resultados obtenidos, además se realizó un análisis de clúster y de los componentes principales. Se logró determinar una relación cercana entre las variables de estudio, en cuanto a la contaminación reflejada, pero no así en cuanto a la contaminación de la leche cruda. Por tanto, se concluye que no existe relación directa entre la calidad de la leche de vaca y el ensilado como fuente de contaminación, ya que representa una relación opuesta según los gráficos de PCA-Biplot, en cuanto a la presencia de *Escherichia coli*, se detectó presencia de *E. coli* en las diferentes muestras analizadas; además se descarta la presencia de *Salmonella spp*, en leche, así como en las otras fuentes de contaminación analizadas. Pero, también se concluye que existe malas condiciones higiénicas en las ganaderías, así como falta de implementación de buenas prácticas de ordeño y que otros factores pueden estar influyendo en la contaminación de la leche, los cuales pueden considerarse en estudios futuros.

PALABRAS CLAVE:

Escherichia coli, *Salmonella spp.*, ensilado, leche cruda, ubre, contaminación, ordeño.

ABSTRACT

For the identification of *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* in raw milk and its relationship with silage as a source of contamination in different regions of El Salvador; a total of 9 livestock farms were studied, 3 livestock farms from the western region, 3 livestock farms from the central region and 3 livestock farms from the paracentral region; In each farm, samples of raw milk, silage, live surface (udder), and inert surface (container) were taken. The samples were transferred to the Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Ministerio de Agricultura y Ganadería, for the determination of *E. coli* and *Salmonella spp.* The results obtained in the laboratory reflected that *E. coli* was identified in 3 silage samples, in 5 raw milk samples, in 6 udder samples and in 6 surface samples. Regarding the detection of *Salmonella spp.*, there was no growth in any sample.

The presentation and analysis of the data is carried out using the R program (version 4.2.1), linear and multivariate regression was carried out with the results obtained, in addition a cluster and principal components analysis was carried out. It was possible to determine a close relationship between the study variables, in terms of reflected contamination, but not in terms of contamination of raw milk. Therefore, it is concluded that there is no direct relationship between the quality of cow's milk and silage as a source of contamination, since it represents an opposite relationship according to the PCA-Biplot graphs, in terms of the presence of *Escherichia coli*, it is detected the presence of *E. coli* in the different samples analyzed; Furthermore, the presence of *Salmonella spp.* is ruled out in milk, as well as in the other sources of

contamination analyzed. But, it is also concluded that there are poor hygienic conditions in the farms, as well as a lack of implementation of good milking practices and that other factors may be influencing the contamination of milk, which can be considered in future studies.

KEY WORDS:

Escherichia coli, *Salmonella spp.*, silage, raw milk, udder, contamination, milking.

INTRODUCCIÓN

Se han realizado una diversidad de estudios en torno a la calidad microbiológica de la leche cruda de vaca, para clasificarla según las categorías Grado A, Grado B y Grado C, también existen estudios que reflejan que la leche cruda es causante de enfermedades transmitidas por alimentos y que dentro de los agentes causales se encuentra la *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* (CDC, 2022), por tal motivo la necesidad de cocción o pasteurización antes de consumir este producto. Pueden existir diversas fuentes de contaminación de la leche, principalmente aquellos materiales que están en contacto con la ubre de la vaca: alimentos y heces; así como factores externos que puedan contaminar la leche al momento de su producción, como puede ser la higiene de las ubres del hato lechero y las condiciones higiénicas de los recipientes que se utilizan para recolectar la leche. Lo anterior, motivó a realizar la identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en leche cruda y su relación con el ensilado como fuente de contaminación en diferentes regiones de El Salvador.

METODOLOGÍA

La investigación de estudio se realizó con un enfoque de estudio prospectivo y experimental.

Muestra

En total se tomaron nueve ganaderías, se seleccionaron tres regiones del país, para realizar el estudio, las cuales son: región occidental, central y paracentral, de las cuales se seleccionaron tres ganaderías, como parte de las unidades de estudios, en cada una de estas ganaderías, se tomaron muestras de ensilado, leche, ubre y superficies para la determinación de *Salmonella spp.*, y *Escherichia coli*. Cada una de las ganaderías cumplían las características de ordeño manual, con sistema estabulado permanente del ganado lechero.

Recolección de las muestras

Para la toma de la muestra de ensilado, se utilizó bolsas plásticas estériles con cierre hermético, se transportó en hielera hacia el laboratorio para conservación de la cadena de frío. El procedimiento para la toma de muestra se realizó tomando 8 submuestras del ensilado que se estaba alimentando el ganado, siguiendo una forma de “W” en el perfil del silo. Se homogenizaron y se tomó la muestra de 500 gramos.

Se recolectaron 200 mL de leche cruda, en bolsas plásticas estériles con cierre hermético, y se trasladaron en cadena de frío hacia el laboratorio.

Para la superficie viva (ubres) y superficies inertes (recipientes), se utilizaron hisopos con medio de transporte (caldo neutralizante) para el muestreo, y garantizando la cadena de frío para el transporte.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos del Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Ministerio de Agricultura y Ganadería, del análisis microbiológico para la detección

de *E. coli* y *Salmonella spp* de muestras de ensilado, leche, hisopado de superficie y ubre, de las nueve ganaderías de estudio. Se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 5. Crecimiento de *E. coli* en las diferentes muestras de las ganaderías de estudio.

Región	Ganadería	Ensilado	Leche cruda	Ubre	Superficie
Paracentral	1	2000 UFC/g	<10 UFC/mL	420 UFC/mL	<10 UFC/mL
Paracentral	2	<10 UFC/g	30 UFC/mL	35 UFC/mL	240 UFC/mL
Paracentral	3	280 UFC/g	10 UFC/mL	1600 UFC/mL	60 UFC/mL
Central	4	<10 UFC/g	20 UFC/mL	10 UFC/mL	15 UFC/mL
Central	5	<10 UFC/g	10 UFC/mL	10 UFC/mL	290 UFC/mL
Central	6	10 UFC/g	<10 UFC/mL	45 UFC/mL	10 UFC/mL
Occidental	7	<10 UFC/g	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	260 UFC/mL
Occidental	8	<10 UFC/g	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL
Occidental	9	<10 UFC/g	120 UFC/mL	<10 UFC/mL	<10 UFC/mL

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Ministerio de Agricultura y Ganadería.

Del análisis de las muestras de ensilado tomadas en diversas ganaderías, se observa que, de las 9 muestras examinadas en el laboratorio, se encontró crecimiento de *E. coli* en 3 de ellas. Este hallazgo sugiere una potencial fuente de contaminación, especialmente considerando que el ensilado se elaboró en áreas abiertas (utilizadas para el pastoreo del ganado), donde diversos animales podrían acceder fácilmente. Además, el proceso de producción del ensilado no incluyó medidas de impermeabilización del suelo. En contraste, en otras ganaderías se dispone de áreas específicas impermeabilizadas y exclusivas para la elaboración del ensilado, con acceso restringido. En relación con los resultados de crecimiento de *E. coli* en la leche cruda, se observa que este microorganismo estuvo presente en muestras de 5 ganaderías. En 4 de estas, también se detectó contaminación en las ubres y superficies, lo que sugiere posibles deficiencias en las prácticas de higiene de las instalaciones ganaderas. Teniendo un crecimiento de 120 UFC/mL en una de las muestras, mientras que las otras 4 mostraron niveles entre 10 y 30 UFC/mL. El valor más alto podría indicar la presencia

de otros factores o fuentes de contaminación, los cuales no se incluyeron en los objetivos del estudio y, por lo tanto, no se puede confirmar con certeza. Los resultados de los hisopados de ubre y superficies revelaron crecimiento de *E. coli* en seis muestras de hisopado de ubre y otras seis muestras de hisopado de superficie. Estos hallazgos reflejan las deficiencias observadas durante las visitas de campo, donde los ordeñadores no aseguran una limpieza adecuada de las ubres durante el ordeño. Además, no se remueve el exceso de excremento de las patas del ganado ni se realiza una limpieza previa del área donde se lleva a cabo esta práctica. Únicamente en la Ganadería 8 no se detectó crecimiento de *E. coli* en ninguna de las muestras analizadas. Esto se atribuye al hecho de que dicha ganadería dispone de un espacio exclusivo para el ordeño, donde se realiza una limpieza y desinfección del área de ordeño. Además, implementan un protocolo de lavado de ubres, patas y cola del ganado antes de ingresar al área de ordeño. De acuerdo con Fuentes-Coto, 2013, en su estudio sobre análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación; establece que la presencia de *E. coli*, es un indicador de que hay problemas de contaminación durante el proceso. Dicha contaminación según El Center for Food Security and Public Health, 2009, reporta que la *E. coli* enterohemorrágica causa diarrea o colitis hemorrágica en los humanos, siendo los bovinos y ovejas, el principal reservorio, ya que se infectan sin presentar síntomas y eliminan el organismo en las heces. Los humanos lo adquieren por contacto directo con los animales portadores, sus heces y el suelo o con el agua contaminada, a través de productos derivados de animales o vegetales contaminados.

Tabla 6. Presencia de *Salmonella* spp, en las diferentes muestras de las ganaderías de estudio.

Región	Ganadería	Ensilado	Leche cruda	Ubre	Superficie
Paracentral	1	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Paracentral	2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Paracentral	3	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Central	4	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Central	5	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Central	6	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Occidental	7	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Occidental	8	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Occidental	9	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Ministerio de Agricultura y Ganadería.

De las muestras analizadas para la determinación de *Salmonella* spp, que en las ganaderías no hubo presencia de *Salmonella* spp, en las diferentes muestras analizadas. A pesar de que en las ganaderías también se encontraban aves de traspatio, entre estos, pollos, patos y otros, que andan libres.

Tabla 7. Prácticas de ordeño identificadas en las ganaderías de estudio.

Región	Ganadería	Limpieza en área de ordeño	Lavado correcto de manos	Lavado de utensilios	Lavado, secado y sellado de pezones
Paracentral	1	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia
Paracentral	2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Paracentral	3	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia
Central	4	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia
Central	5	Presencia	Presencia	Ausencia	Presencia
Central	6	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia
Occidental	7	Presencia	Presencia	Ausencia	Presencia
Occidental	8	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
Occidental	9	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia

Nota: Fuente propia.

De las ganaderías donde se tomaron las muestras del estudio, se logró observar que no todas realizaban buenas prácticas de ordeño. De las cuales algunas efectuaban la limpieza en el área correcta para el ordeño, pero otras no contaban con instalaciones adecuadas y no permitían la eficiente limpieza; así como no practicaban la adecuada limpieza de manos de los ordeñadores y el lavado de utensilios y pezones se realizó con agua de consumo

para el ganado, variable que no fue incluida en los resultados obtenidos.

Utilizando el programa R (versión 4.2.1), se realizó regresión lineal indicando que el modelo no muestra una relación significativa entre la variable dependiente (leche) y la variable independiente (ensilado), dado que el valor p asociado con el coeficiente de ensilado es alto (0.596), lo que sugiere que no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula de que el coeficiente es igual a cero. Además, el R-cuadrado relativamente bajo (0.04211) indica que el modelo no explica mucha variabilidad en la variable dependiente.

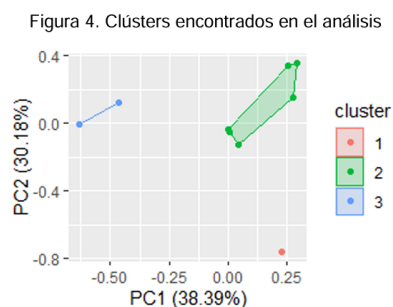
La relación de la variable dependiente y la variable independiente (ubre), existe una variabilidad del 3.51%, lo que indica que el modelo no explica mucha variabilidad en la variable dependiente basada en las variables independientes incluidas en el modelo.

En cuanto a la variable independiente (superficie), existe una variabilidad del 4.34%, lo cual no explica mucha variabilidad con la variable dependiente. Esto sugiere que no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula.

De acuerdo a los datos obtenidos, se puede observar que las variables independientes no se identificaron como responsables de la contaminación de la leche; lo cual indica que podrían haber otras variables que no fueron consideradas en el estudio, que pudieran estar relacionada con la variable dependiente; según algunos estudios consultados, una fuente de contaminación de la leche está relacionado con la contaminación por el estiércol del ganado, esto debido al manejo inadecuado en las ganaderías.

También podemos decir que el número de unidades de estudio fue muy limitado para poder establecer una diferencia notable y poder ampliar el análisis y la relación entre las variables de estudio; esto debido a que no se contaba con más presupuesto para ampliar el número de ganaderías.

Se realizó un análisis de clúster a partir de los datos obtenidos, los cuales se representan gráficamente de la siguiente forma:



Nota. En la figura se puede observar cada clúster.

Se formaron 3 clústers donde se agrupan las ganaderías según los resultados de las muestras de *E. coli* que mostraron valores destacados en comparación con el resto. A continuación, se presenta la conformación de los clústers y su análisis:

Clúster 1: Ganadería 9 se distingue por el mayor crecimiento de *E. coli* en la muestra de leche analizada, destacándose significativamente respecto a otras ganaderías. Una característica de este clúster es que en las muestras tomadas en dicha ganadería solamente presentó crecimiento de *E. coli*, en la muestra de leche; lo que pudiera indicar una contaminación puntual, para lo cual se debe realizar una inspección en el área de almacenamiento de la leche y poder corregir alguna deficiencia.

Clúster 2: Ganadería 2, Ganadería 4, Ganadería 5, Ganadería 6, Ganadería 7 y

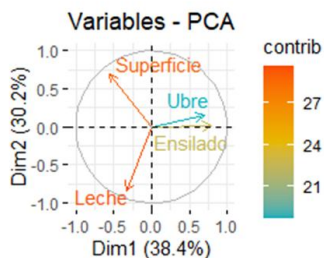
Ganadería 8 muestran variaciones en los resultados de crecimiento de *E. coli*, sin formar un patrón claro que permita agruparlas en un clúster diferenciado.

La identificación de contaminación por *E. coli* en diferentes muestras en las ganaderías, requiere que se implementen un programa de buenas prácticas de ordeño, así como identificar las posibles fuentes de contaminación y tomar las medidas necesarias para eliminarlas.

Clúster 3: Ganadería 1 y Ganadería 3 se agruparon debido al notable crecimiento de *E. coli* en sus muestras, valores que son significativos en comparación con el resto de las muestras y ganaderías: 2000 UFC/mL en muestra de ensilado y 1600 UFC/mL en muestra de hisopado de ubre. Este clúster se caracteriza por presentar los valores más altos de *E. coli*, en estas ganaderías se debe realizar una inspección para identificar la fuente de contaminación y tomar las medidas necesarias para la eliminación de estas.

Se llevó a cabo un análisis de componentes principales para explorar la variabilidad de los datos en relación con las variables de estudio, con el fin de determinar posibles relaciones directas entre ellas. Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 6.

Figura 5. Relación entre las distintas variables estudiadas dentro de los componentes principales



Nota. La figura demuestra la relación de las variables en estudio.

Según la representación gráfica del análisis de componentes principales, en la dimensión Dim1 se observa que refleja el 38.4% de la variabilidad de los datos, indicando la relación entre las variables de estudio. En la figura, se puede notar que el ensilado y la ubre están alineados en la misma dirección y muy próximos entre sí. Esto sugiere la posibilidad de una fuente común de contaminación, la cual puede ser el estiércol de ganado, debido al mal manejo y disposición final del mismo; así como la falta de limpieza del área de ordeño y la deficiente limpieza de ubres y pezones. Además, durante las visitas a las diferentes ganaderías, se observó que los lugares de elaboración y almacenamiento del ensilado están abiertos y accesibles al ganado, el cual pasta brevemente antes de ser confinado en corrales. Esta situación facilita la contaminación del ensilado con *E. coli* a través de las heces del ganado.

Asimismo, las ubres del ganado pueden contaminarse, especialmente en los corrales que carecen de un adecuado sistema de drenaje y presentan deficiencias en la limpieza. Es importante considerar que los bovinos son reservorios primarios de *E. coli*. Según Narvaez-Bravo, 2017 en su estudio sobre el "Aislamiento de *Escherichia coli* en muestras de heces de ganado bovino de doble propósito", encontró aislamientos de 6 cepas de *E. coli*, lo que representó el 1.94% de muestras positivas. Aunque todo el ganado estaba asintomático, el estiércol del ganado podría ser una fuente potencial de contaminación tanto para el ensilado como para las ubres.

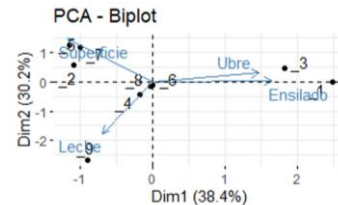
En relación con la Dim2, esta dimensiona la variabilidad de los datos en un 30.2%. Al observar el gráfico, se nota que la variable superficie y leche están en la misma dimensión, pero en direcciones opuestas, lo

cual sugiere que no hay una relación directa entre estas variables. Lo anterior se puede deber a que existen otras condiciones que pueden estar influyendo en la contaminación por *E. coli* en estas variables; como puede ser, la contaminación de las superficies donde se recolecta la leche, ésta podría estar relacionada con prácticas inadecuadas de lavado y almacenamiento de los recipientes, ya que una deficiente limpieza puede favorecer el crecimiento bacteriano en las superficies de los utensilios por las condiciones de humedad y temperatura, más aún si quedan con residuos de leche que pueden ser un ambiente propicio para la reproducción de bacterias.

Es importante considerar que el agua utilizada para la limpieza en las instalaciones de las ganaderías proviene principalmente de pozos u otros reservorios de agua superficial, los cuales no reciben tratamiento de desinfección previo. Esta falta de agua segura para la limpieza y desinfección de los recipientes utilizados en la recolección de la leche podría propiciar el crecimiento de microorganismos. Además, los recipientes se mantienen al aire libre sin medidas de protección adicionales, lo que puede contribuir aún más a la contaminación. Por esa razón, se había considerado analizar muestras de agua para consumo en los animales, para determinar la presencia de *Salmonella spp.* y *E. coli*; sin embargo, debido a la metodología realizada con Petrifilm en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Ministerio de Agricultura y Ganadería, los resultados obtenidos no son válidos ya que el Reglamento Técnico Salvadoreño de agua de consumo humano está basada en la guía de la calidad del agua de la Organización Mundial de la Salud, donde no coincide la cantidad de muestra analizada con la que establece el RTS, por

eso se consideró no incluir los resultados obtenidos.

Figura 6. Biplot de las variables estudiadas y las ganaderías monitoreada.



Nota. En la figura se observan las variaciones del estudio.

En la figura 4 se observan las ganaderías que muestran una relación cercana en cuanto al crecimiento de UFC/mL de *E. coli* en las variables de estudio. La Ganadería 1 destaca por presentar un alto crecimiento de *E. coli* en ensilado, con 2000 UFC/mL. La Ganadería 3 muestra un notable crecimiento de *E. coli* en ubre, con 1600 UFC/mL. Las ganaderías 2, 5 y 7 registran valores de *E. coli* en superficie entre 240 y 290 UFC/mL. La Ganadería 9 exhibe el mayor crecimiento de *E. coli* en leche, con 120 UFC/mL. Las Ganaderías 4 y 6 se sitúan cerca del vértice, con valores de crecimiento de *E. coli* en las diversas muestras entre 10 y 45 UFC/mL, sin clasificarse en una variable de estudio específica. Por último, la Ganadería 8 se encuentra en el vértice debido a que los resultados reflejados son <10 UFC/mL para todas las variables de estudio. Esta figura es de utilidad para poder identificar las variables que se relacionan más entre ganaderías y la similitud de las mismas, lo cual nos ayuda a la toma de decisiones para poder establecer las posibles fuentes de contaminación y tomar las medidas correctivas y así disminuir la probabilidad de contaminación de la leche, y evitar el riesgo de adquirir enfermedades gastrointestinales.

CONCLUSIONES

Las variables independientes (ensilado, ubre y superficie) y la variable dependiente (leche) no reflejan una relación significativa en términos de la contaminación por *E. coli*. Por lo que otros factores pueden estar influyendo en la contaminación de la leche, los cuales pueden considerarse en estudios futuros.

La contaminación del ensilado por *E. coli*, puede estar relacionado a una contaminación por estiércol del ganado, ya que se encuentran pastoreando en los lugares donde tienen almacenado el ensilado. De acuerdo con estudios consultados el principal reservorio de *E. coli*, es el ganado y se ha detectado la presencia en el estiércol.

Las inadecuadas prácticas de la limpieza y desinfección de las instalaciones, ubres y equipo de ordeño, contribuye al recuento de *E. coli* en las ubres del hato lechero.

La falta de implementación de programas de limpieza de utensilios, así como de las instalaciones puede aportar al crecimiento de *E. coli* en la superficie de los recipientes donde se colecta la leche, sumado a que no cuentan con agua segura para realizar este procedimiento.

La determinación de presencia de *Salmonella spp.* en las variables de estudio, no refleja una contaminación por este microorganismo, a pesar de que en las ganaderías se encontraban aves de corral. No se puede confirmar la presencia de *Salmonella spp.* porque no se analizaron otras variables en el presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aministración de Alimentos y Medicamentos. (2018). Los peligros de la

leche cruda: La Leche sin pasteurizar puede representar un riesgo grave para la salud. <https://www.fda.gov/es/node/390100>

Aguilera Becerra, A.M., Urbano Cáceres, E. X. y Jaimes Bernal, C.P. (2014). Pathogenic bacteria in raw milk: a public health and food safety problem. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5191851.pdf>

Centers for Disease Control and Prevention. (CDC, 2013). An Atlas of Salmonella in the United States, 1968–2011: Laboratory-based Enteric Disease Surveillance. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, Georgia, USA.

Fuentes-Coto, Gerardo, Rocío A. Ruiz-Romero, José I. Sánchez Gómez, Dolores N. Ávila-Ramírez, and Jorge Escutia-Sánchez. "Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación." Agricultura Sociedad y Desarrollo 10, no. 4 (December 31, 2013): 419. <http://dx.doi.org/10.22231/asyd.v10i4.134>.

Gaviria, B. C. (2007). Calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda. Laboratorio Biogénesis. Fondo Editorial. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/download/328079/20785048/>

Herrera, C. (2019) *Síndrome Diarreico* [seminario Web]. Universidad San Sebastián. http://www.saludinfantil.org/Seminarios_Pediatrica/Gastroenterologia/Sindrome_Diarreico.pdf

Jiménez Manso, A., Babich J., Sánchez Moreno, M. P. y Fernández Valenti, M. L. (2022). Ensayos

microbiológicos en alimentos en brotes de transmisión alimentaria. Procedimiento de Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. <https://seimc.org/contenidos/documentoscience/ntificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento78.pdf>

Junod, T., López-Martin, J., & Gadick, P. (2013) *Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de Salmonella enterica* en muestras de origen animal y alimentario. *Revista Médica de Chile*, 141(3), 1, <https://www.scielo.cl/pdf/rmc/v141n3/art03.pdf>

Kaper, J.B., Nataro, J.P., & Mobley, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. En: *Nat Rev Micro*. 2004. Vol. 2, N° 2, p. 123-140.

Ksenija, N., Radmila, Mitrovic y Radmila Markovic. (2021). Categorization of animal feed according to microbiological quality preferable improvement in the food chain. <https://veterinarnar.vet.bg.ac.rs/handle/123456789/2284?locale-attribute=en>

Lynn, T. V., Hancock, D. D., Besser, T. E., Harrison, J. H., Rice, D. H., Stewart, N.T. y Rowan, L. L. (1998). The occurrence and replication of *Escherichia coli* in cattle feeds. *J. Dairy Sci.* 81:1102–1108

Moreno Vásquez, F. C., Rodríguez Martínez, G., Méndez Mancera, V. M., Osuna Ávila, L. E. y Vargas, M. R. (2007). 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).

<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-503649>

Narváez Bravo, C., Carruyo Núñez, G., Moreno, M., Rodas González, A., Hoet, A., & Wittum, T. (2017). Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del Municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica De La Facultad De Ciencias Veterinarias De La Universidad Del Zulia*. Recuperado a partir de <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/15281>

Norma Salvadoreña Obligatoria 67.01.01:06. (1993). Comité Técnico de Normalización del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT. https://www.oirsa.org/contenido/2017/EI_Salvador_INOCUIDAD/19.%20NSO%2067%2001%2001%2006%20LECHE%20CRUDA%20DE%20VACA%20Y%20ESPECIFICACIONES%2020PRIMERA%20ACTUALIZACION.pdf

Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. (OIRSA, 2018). Manual de introducción a la inocuidad. <https://www.oirsa.org/contenido/2019/Manual%20de%20Introduccion%20a%20la%20Inocuidad%20de%20los%20alimentos%20-%20OIRSA.pdf>

Organismo Mundial de la Sanidad Animal. (OMSA, 2018). Manual Terrestre. Capítulo 3.9.8. Salmonelosis. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.09.08_SALMONELLOSIS.pdf

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (FAO, 2009). Enfermedades

transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria, <https://www.fao.org/3/i0480s/i0480s.pdf>

11/Buenas%20Pra%CC%81cticas%20de%20Orden%CC%83o.pdf

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *Prevención de la E. coli en los alimentos*, Estados Unidos: FAO; (2011) http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf

Organización Mundial de La Salud. (OMS, s.f.). *Enfermedades de Transmisión Alimentaria*. https://www.who.int/es/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_3

Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. (OPS/OMS, s.f.). *Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)*. https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0

Queiroz, O. C., Ogunade, I. M., Weiberg, Z. y Adesogans, A. T. (2018) Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021830331X>

The Center for Food Security and Public Health. 2009. *E. coli enterohemorrágica*. Iowa State University. Iowa, USA.

USAID, (s.f.). *Buenas Prácticas de Ordeño (BPO)*. Programa de Alianzas Comerciales. <https://files.rcnradio.com/2020>