


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE ZOOTECNIA**



**“DETERMINACIÓN DE LA CONFIABILIDAD DE LA TÉCNICA
BIOLUMINISCENCIA EN LA EVALUACIÓN HIGIÉNICA A NIVEL DE
PEZONERA, EN COMPARACIÓN CON EVALUACIONES
MICROBIOLÓGICAS DE LABORATORIO.”**

LINDA LILY RAXÓN SOLARES

LICENCIADA ZOOTECNISTA

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2011

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE ZOOTECNIA**

**“DETERMINACIÓN DE LA CONFIABILIDAD DE LA TÉCNICA
BIOLUMINISCENCIA EN LA EVALUACIÓN HIGIÉNICA A NIVEL DE
PEZONERA, EN COMPARACIÓN CON EVALUACIONES
MICROBIOLÓGICAS DE LABORATORIO.”**

TESIS

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD
DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD DE
SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR

LINDA LILY RAXÓN SOLARES

AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADA ZOOTECNISTA

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2011

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO: Med. Vet. Leonidas Ávila Palma
SECRETARIO: Med. Vet. Marco Vinicio García Urbina
VOCAL I: Lic. Zoot. Sergio Amilcar Dávila Hidalgo
VOCAL II: M.Sc. Med. Vet. Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III: Med. Vet. y Zoot. Mario Antonio Motta González
VOCAL IV: Br. Javier Enrique Baeza Chajón
VOCAL V: Br. Ana Lucia Molina Hernández

ASESORES

MSc. Carlos Enrique Saavedra Vélez

M.A. Carlos Enrique Corzantes

M.A. Silvia María Zea de Ortiz

Med. Vet Virginia de Corzo

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de tesis titulado:

“DETERMINACIÓN DE LA CONFIABILIDAD DE LA TÉCNICA BIOLUMINISCENCIA EN LA EVALUACIÓN HIGIÉNICA A NIVEL DE PEZONERA, EN COMPARACIÓN CON EVALUACIONES MICROBIOLÓGICAS DE LABORATORIO.

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar el título profesional de:

LICENCIADA ZOOTECNISTA

TESIS QUE DEDICO

- A DIOS:** Por regalarme el don de la vida y nunca apartarse de mi lado en este gran camino, TE AMO.
- A MI VIRGENCITA:** Por protegerme con tu manto madrecita y por interceder por mi ante Dios nuestro señor.
- A MIS PADRES:** Cesar Raxón y Gloria Solares por todo su apoyo, este trabajo es por ustedes y para ustedes.
- A MI HERMANA:** Olga Beatriz por tenerme paciencia y comprensión durante todos estos años.
- A MI TIA OLGA:** Por ser mi principal ejemplo a seguir, por tu confianza y apoyo incondicional.
- A MIS ABUELITAS:** Mamaíta y abuelita Licha (QPD) por confiar en mí y todo el apoyo brindado durante mi vida.
- A MI PROMETIDO:** Nelson, gracias por motivarme siempre a no caer ante la adversidad, gracias por tu amor, paciencia y compañía durante este largo camino y enseñarme que el único obstáculo para lograr algo, es uno mismo.
- A MIS SOBRINOS:** María Rene, Carlos Giovanni, Melanie Lucrecia, Stefany Nicole, por su alegría y ser mi motivación para enseñarles con el ejemplo que todo lo que se propongan se puede alcanzar.

AGRADECIMIENTOS

- A MI FACULTAD:** Por ser el lugar en donde obtuve las herramientas y conocimientos para crecer como profesional y enseñarme el servicio como el amor a Guatemala.
- A MIS AMIGOS:** Sigrid, Luís G, Kevin, Hellen, Luís V, Alejandro F, Rodrigo, Amador, Jorge, Astrid y a cada uno de mis compañeros de promoción XL de Zootecnia como de Veterinaria, gracias por todo su apoyo y amistad compartida durante 6 años.
- A MIS ASESORES:** A todos los licenciados de la Escuela de ZOOTECNIA y en especial a: MSc. Carlos Enrique Saavedra Vélez, M.A. Carlos Enrique Corzantes, M.A. Silvia María Zea de Ortiz, Med. Vet. Virginia de Corzo.
- A MI FAMILIA:** Por su apoyo y confianza incondicional y ser mi principal casa de estudio.
- FAMILIA PÉREZ GARCÍA:** Por su incondicional apoyo y motivación durante mi largo camino de aprendizaje tanto personal como profesional.
- A:** La Cámara de Productores de Leche de Guatemala (CPLG) y Coopelac.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS	3
III.	OBJETIVOS	4
3.1	General	4
3.2	Específicos	4
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1	Contaminación de la leche	5
4.1.1	Fuentes de Contaminación de la leche cruda	5
4.2	Ordeño mecánico	6
4.3	Recuento de microorganismos UFC	7
4.4	Técnica de Bioluminiscencia	9
4.4.1	Estudios realizados	10
4.4.2	Puntos críticos	11
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1	Localización	12
5.2	Selección de fincas y duración del estudio	12
5.3	Materiales	13
5.4	Manejo del estudio	14
5.4.1	Primera Etapa: Evaluación del método de limpieza	14
5.4.2	Segunda Etapa: Evaluación higiénica a nivel de pezoneras	14
5.4.2.1	Evaluación higiénica a nivel de pezoneras mediante La técnica de bioluminiscencia	14
5.4.2.2	Evaluación higiénica a nivel de pezoneras mediante El hisopado de superficies	15
5.5	Metodología obtención de variables	16

VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
6.1	Primera Etapa: Evaluación del método de limpieza	17
6.2	Segunda Etapa: Evaluación higiénica en pezoneras con La técnica tradicional y de bioluminiscencia por ATP	20
6.2.1	Análisis Estadístico	20
VII.	CONCLUSIONES	24
VIII.	RECOMENDACIONES	25
IX.	RESUMEN	26
	SUMMARY	27
X.	BIBLIOGRAFÍA	29
XI.	ANEXOS	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Límites según tipo de material a muestrear -----	10
Cuadro 2.	Límite de aceptación de los resultados en la evaluación del estado higiénico a nivel de pezoneras -----	16
Cuadro 3.	Actividad de los métodos de limpieza en comparación la normativa COGUANOR NGO 34-234 No. 10 -----	17
Cuadro 4.	Manejo de limpieza manual en comparación con la normativa COGUANAOR NGO 34-234 No. 10.3.2 -----	18
Cuadro 5.	Resultados obtenidos de la evaluación higiénica a nivel de pezoneras con la técnica de laboratorio y bioluminiscencia.	21
Cuadro 6.	Sensibilidad de la técnica de bioluminiscencia ante la presencia de microorganismos-----	23

I. INTRODUCCIÓN

Algunas superficies en contacto con los alimentos son consideradas puntos críticos de control (PCC) en un programa de Hazard *Analysis and Critical Control Points* (HACCP). Dentro de la metodología se requiere que el monitoreo de los mismos, provea resultados rápidos y acciones correctivas inmediatas.

La disponibilidad de técnicas rápidas y precisas, son necesarias para un diagnóstico temprano de la contaminación bacteriológica de los alimentos; en las etapas de producción y de procesamiento industrial.

En este sentido, la técnica de bioluminiscencia de adenosín trifosfato (ATP) se ha recomendado para este tipo de procedimientos a fin de verificar la eficiencia de higiene en la industria alimenticia y asegurar la calidad del producto. (Páez R.1999 INTA).

La técnica se basa en la reacción enzimática que ocurre al enfrentar una solución de adenosín trifosfato ATP (moléculas) y luciferina con la enzima luciferasa, emitiendo un haz de luz cuya intensidad es directamente proporcional al contenido en ATP. Conociendo la cantidad de adenosin trifosfato, conoceremos la cantidad de agentes contaminantes dando como resultado las Unidades Relativas de Luz.

Tradicionalmente se realizan técnicas a nivel de laboratorio donde los resultados son datos que se estiman en Unidades Formadoras de Colonias, este valor indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente o superficie.

Esta técnica expresa el número de colonias las cuales representan una población de microorganismos procedentes de una sola célula, a partir de la cual se posee la seguridad de obtener dicho cultivo puro de un solo tipo de microorganismo teniéndose los resultados entre un lapso de 15 a 8 días ; por lo tanto la evaluación de higiene mediante la técnica de bioluminiscencia ATP, no indica las Unidades

Formadoras de Colonia, y sus resultados se obtienen en el momento, por lo cual fue necesaria la evaluación microbiológica de laboratorio.

II. HIPÓTESIS

La técnica de bioluminiscencia, es efectiva en la evaluación higiénica en presencia de agentes contaminantes a nivel de pezoneras en comparación a resultados de laboratorio y estándares internacionales de calidad higiénica.

III. OBJETIVOS

3.1 General

- Generar información sobre la técnica de bioluminiscencia, para evaluar el estado higiénico del equipo de ordeño.

3.2 Específicos

- Determinar la confiabilidad de la técnica de bioluminiscencia para la evaluación del estado higiénico a nivel de pezoneras.
- Establecer si los resultados obtenidos cumplen las Normas de COGUANOR NGO 34-234. Código de prácticas para la limpieza y desinfección en la industria de productos lácteos.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Contaminación de la leche

Uno de los factores que mayor influencia ofrecen dentro de la cadena industrial de la producción de leche es el microbiano, como lo son: bacterias, levaduras y mohos, procedentes del interior de la ubre o del medio externo y en éste caso llegan a la leche a través del ordeño. Los microorganismos se desarrollan fácilmente en la leche, multiplicándose con extraordinaria velocidad y produciendo diversas modificaciones en la composición y constitución de la leche, hasta tal punto que con frecuencia se altera haciéndolo impropio para el consumo o bien imposibilitan su aprovechamiento industrial.

4.1.1 Fuentes de Contaminación de la Leche Cruda

Las Principales fuentes de contaminación de la leche cruda son:

a. El animal: teóricamente la leche al salir del pezón debería ser estéril, pero siempre contiene de 100 a 10,000 bacterias/ml, una baja carga microbiana que puede no llegar a multiplicarse si la leche es manipulada adecuadamente. Los microorganismos pueden entrar por vía mamaria ascendente a través del esfínter del pezón, es por ello que cualquier lesión que afecte la integridad del mismo, facilitará un aumento en la contaminación. La leche puede también contaminarse al salir por medio de pelos sucios que se desprenden de los animales. La ubre está en contacto con el suelo, heno, y cualquier superficie donde las vacas se echan, de allí que los pezones sean considerados como una fuente importante. (David R. 2008)

b. Aire: el aire representa uno de los medios más desfavorables para la supervivencia de los microorganismos debido a la constante exposición al oxígeno, cambios de temperatura y humedad relativa, radiación solar, etc. Es por ello que sólo aquellos microorganismos resistentes podrán ser capaces de permanecer en el aire y llegar a contaminar los alimentos. (David R. 2008)

c. Agua: el agua utilizada para la limpieza de los equipos y utensilios de ordeño, la higiene del animal y del personal debe ser lo más limpia posible. El agua puede ser una fuente importante de microorganismos y por contaminación de esta, por bacterias. (David R. 2008)

d. Suelo: el suelo es la principal fuente de microorganismos. La leche nunca entra en contacto con el suelo pero sí los animales, utensilios y personal, de manera que es a través de ellos que los microorganismos pueden alcanzar a contaminar la leche. (David R. 2008)

e. El ordeñador: el ordeñador puede llegar a jugar un papel importante en la contaminación de la leche, sobre todo cuando el ordeño es manual. En nuestro medio es frecuente observar como el personal encargado del ordeño no se lava las manos. Se ha señalado al ordeñador como responsable de la contaminación de la leche con microorganismos patógenos. Las heridas infectadas en manos y brazos pueden ser fuentes de algunos de estos microorganismos. (David R. 2008)

f. Estiércol: el estiércol es otra de las fuentes principales sobre la presencia de microorganismos. Estos pueden alcanzar la leche a través del animal o del ordeñador así como también por medio de los utensilios mal higienizados o manejados. (David R. 2008)

g. Utensilios y Transporte: el contacto de la leche con el material de ordeño y su permanencia en los tanques y transporte puede multiplicar de 2 a 50 la flora microbiana presente. De allí que la higiene adecuada de estos, por medio de agentes desinfectantes, afecta significativamente la calidad sanitaria de la leche. (David R. 2008)

4.2 Ordeño mecánico y su limpieza

La implementación del ordeño mecánico y el enfriado, introdujeron cambios cuantitativos y cualitativos en la flora microbiana, aspectos que deben tenerse muy

en cuenta dado que la conservación de la leche con sus propiedades físico-químicas depende de su carga bacteriológica. (Heer G, Geottig M s.f)

El estudio de los sistemas de lavado y de los factores que influyen en la contaminación permiten aseverar, que cuando la leche cruda supera las 100.000 UFC/ml, la causa principal es la falta de una adecuada higiene del equipo de ordeño.

Las pezoneras y los tubos largos de leche cuando no se elabora la limpieza adecuadamente, son una importante fuente de contaminación, especialmente de bacterias. (David R, 2008)

La “piedra de leche” compuesta por lactosa, proteínas, grasa, fosfatos de calcio, carbonatos y agua, favorecida por la dureza del agua y las altas temperaturas, brinda protección y sustento a las bacterias que aloja. La eliminación de esos depósitos proteico-minerales con los lavados ácidos diarios elimina a su vez la fuente de contaminación. (Heer G, Geottig M s.f)

Normalmente, los agentes de limpieza se elaboran con detergentes y desinfectantes, por ser estos más fácil de utilizar, ya que elimina el riesgo que conlleva el mezclar productos químicos. Cuando se cambia de un detergente alcalino a uno ácido, es importante asegurarse de que se elimina el alcalino por completo antes de aplicar el detergente ácido. De otro modo, se podría neutralizar su efecto. (Control de Contaminación INIEA 2005)

4.3 Recuento de microorganismos UFC (Unidades Formadoras de Colonias)

Las Unidades Formadoras de Colonias es un valor que indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente que expresa el número relativo de microorganismos determinado; en un área específica expresado en UFC es el número mínimo de células separables sobre la superficie, o dentro de un medio de agar semi-sólido que da lugar al desarrollo de una colonia visible del orden de decenas de millones de células descendientes.

Estos microorganismos están presentes en el medio ambiente; por lo tanto su presencia en la leche se debe a un deficiente lavado de los pezones sucios o cuando se caen las unidades de ordeño y estas absorben la suciedad del piso. Cualquier superficie en contacto con la leche es una fuente potencial de infección. Por lo tanto, es muy importante limpiar y desinfectar cuidadosamente todo el equipo. (David, R. 2008)

La calidad microbiológica de la leche cruda, se ve afectada por una mala limpieza de los equipos de ordeño, así mismo se señala que el contenido de bacterias en la leche depende especialmente del grado de limpieza de las máquinas, utensilios de lechería y de la correcta higiene durante la extracción de la leche. (Control de Contaminación INEA 2005)

De acuerdo a lo señalado por Ponce de León (1993), uno de los principales factores que inciden en la obtención de una leche de “buena” calidad microbiológica, es el grado de limpieza del proceso de ordeño, pues la contaminación inicial es uno de los factores más importantes que determinan el número de microorganismos de la leche. (Heer G, Geottig M s.f)

Por otro lado, se indica que los equipos de lechería podrían contribuir con $4,0 \times 10^3$ UFC/mL a la cantidad inicial de bacterias de la leche, que bajo buenas condiciones higiénicas, puede tener un total de $1,0 \times 10^4$ UFC/ml. Sin embargo, una deficiente limpieza aumenta considerablemente esta cantidad, la que según Ponce de León (1993), puede llegar hasta $5,0 \times 10^5$ UFC/ml. lo más.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1997), Hayes (1993) y Stanley (2002), la limpieza aparente puede inducir a engaño, por consiguiente suele ser deseable confirmar el nivel de limpieza y desinfección mediante análisis microbiológicos de muestras procedentes del equipo. Dicha información se ha utilizado para establecer límites a los niveles microbianos de los equipos.

4.4 Técnica de Bioluminiscencia

La técnica de determinación de higiene por (adenosín trifosfato) ATP - Bioluminiscencia puede ser utilizada en cualquier tipo de industria de Alimentos (Lácteos, Bebidas, Productos Cárnicos, Comidas Preparadas, etc) y específicamente para monitoreo de higiene de superficies de contacto directo.

La ATP-Bioluminiscencia está basada en una reacción que ocurre en forma natural en las luciérnagas (*Photinus pyralis*). La reacción bioluminiscente catalizada por la luciferasa utiliza la energía química contenida en la molécula de ATP para producir la descarboxilización oxidativa de la luciferina a oxiluciferina, dando como resultado la producción de LUZ, la cantidad de luz emitida es proporcional a los niveles de microorganismos y/o materia orgánica presente.

Ventajas

- Rapidez en la obtención de los resultados: Lectura de resultados en 11 segundos.
- Instrumental de fácil manejo: Equipos portátiles
- Técnica sencilla: Hisopado de superficies
- Resultados estimulantes: La implementación como monitoreo de las condiciones higiénicas motiva al personal encargado de las tareas de limpieza y desinfección que tienen la posibilidad de ver los resultados del análisis efectuado.
- Prevención de fallas mayores: Permite llevar a cabo acciones correctivas ante fallas en la condición higiénica de las superficies de contacto directo sin que los alimentos lleguen a contaminarse.

4.4.1 Estudios realizados

Según estudios publicados en el anuario 2001 de producción animal. realizado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Determinaron que la Técnica de Bioluminiscencia obtiene la cantidad de ATP presente en las células, recuperado por medio de un hisopo, que posee un complejo enzimático que convierte la energía química del ATP presente, en una muestra en luz a través de una reacción de óxido reducción. La cantidad de luz generada por esta reacción es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra. El resultado de la técnica se expresa en unidades relativas de luz (URL).

Los resultados se obtienen por medio del Luminómetro que transforma directamente el resultado de URL, valor que posteriormente se asocia con una escala, la cual está dividida en zonas de limpieza correspondiendo los valores (Páez R.2001 INTA)

Para el luminometro (Novalum) que se utilizó durante el presente estudio los límites establecidos de pasa o falla son los presentados en el siguiente cuadro:

Cuadro 1
Limites según tipo de material a muestrear

Superficie	Límite bajo	Límite alto*
Acero Inoxidable	URL = 0	URL = 500
Teflón	URL = 0	URL = 1,000
Plástico	URL = 0	URL = 1,500
Aluminio	URL = 0	URL = 2,000
Caucho	URL = 0	URL = 2,500

* Características propias de la superficie definirán conteos obtenidos

4.4.2 Puntos críticos

La técnica mide la bioluminiscencia generada por la cantidad de residuos de la leche o microbianos: En un estudio realizado en 1999 determinaron que, una vez finalizado el ordeño se procedió a realizar tres lavados sucesivos (incluyendo la secuencia completa de prácticas). Después de cada lavado se hisoparon los siguientes puntos del equipo: boca de la pezonera, cuerpo de la pezonera, tubo corto de leche, parte superior del colector, parte inferior del colector, tubería de leche (parte terminal) y recibidor. (Páez R.1999 INTA) El análisis de evolución de estos resultados la lectura del luminómetro para cada parte del equipo después de cada lavado, permitió seleccionar cinco puntos de control donde se eliminó el cuerpo de la pezonera y el tubo corto de leche, puesto que para las condiciones experimentales utilizadas en esta investigación, no presentaron ninguna dificultad para su lavado. Los puntos de control retenidos fueron, finalmente, los siguientes: recibidor, colector parte superior, colector parte inferior, boca de pezonera y tubería de leche (Páez R.1999 INTA)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización

El estudio se realizó en fincas de los asociados a la Cámara Productores de Leche (CPLG) la cual tiene sede en la 3^a Avenida 12-65 zona 9 de la Ciudad Capital también asociados de Cooperativa de Productores de Leche (COOPROLECHE) ubicada en Boulevard Vista Hermosa 25-80 Z.15 Vista Hermosa II Edificio María del Alma Local No.2

5.2 Selección de Fincas y duración del estudio

Las fincas que se seleccionaron en el estudio, tenían como requisito el consentimiento de los productores para su participación, llenando los siguientes aspectos:

- Pertener a la Cooperativa (COOPROLECHE) o (a la cámara de productores de leche).
- Que el proceso de ordeño fuese mecánico.
- Que realizarán limpieza del equipo de ordeño.

Siguiendo los criterios mencionados se seleccionaron 6 fincas, en acuerdo con la cámara de productores, los cuales aportaron el luminómetro (Novalum) y los hisopos (Pocketswab plus), materiales utilizados dentro del estudio. El estudio tuvo una duración de 3 meses, iniciando a mediados del mes de noviembre del 2010, finalizando en el mes de Febrero del 2011. Dentro de la duración de este estudio se contempló, un mes para la compra de hisopos, calendarización de la visitas a las fincas, contacto con los propietarios, y dos meses para la recolección de datos con las boletas de inspección (Anexo No1), toma de muestra y análisis de laboratorio.

5.3 Materiales

- Hisopos de (adenosín trifosfato) ATP para muestreo de superficies (Pocketswab plus)
- Hisopos esterilizados para muestreo de superficies
- Luminómetro (Novalum)
- Medios de cultivo (Caldo)
- Tubos de ensayo
- Hielera
- Hielo
- Bolsas
- Masking tape
- Boleta de inspección
- Fotocopias
- Bolígrafo
- Cámara fotográfica digital
- Botas de hule
- Bata
- Guantes
- Automóvil
- Fincas asociadas a Cámara productores de leche o COPROLECHE

5.4 Manejo del estudio

5.4.1 Primera Etapa: Evaluación del método de limpieza

Para la evaluación de la rutina de ordeño, se visitó en horarios de la mañana las fincas seleccionadas para verificar cómo realizaban la limpieza en la sala de ordeño.

Durante este período, se aplicó y evaluó a través de una boleta de chequeo previamente elaborada (Anexo 1) cada uno de los pasos que implicaba la rutina de limpieza, repitiendo este proceso para las 6 fincas seleccionadas, esto para establecer su cumplimiento a las Normas de COGUANOR NGO 34-234 (1,993), y hacer la respectiva comparación.

5.4.2 Segunda Etapa: Evaluación higiénica a nivel de pezoneras

5.4.2.2 Evaluación higiénica de pezoneras mediante la técnica de bioluminiscencia.

Para la evaluación higiénica de las pezoneras la muestra se obtuvo después de la limpieza *in situ* del ordeño de la mañana, para lo cual se procedió de la siguiente manera:

1. Se utilizaron 4 hisopos de ATP por finca, ya que se evaluaron 4 pezoneras una sola vez, el hisopo se destapó para realizar el hisopado o frote en el interior de la pezonera.
2. Se tapó de nuevo el hisopo de ATP con su respectivo tapón, se realizó un giro para dejar la muestra sobre un medio de preservación para luego colocar el hisopo en posición vertical para depositarlo dentro de la hielera y ser transportado en menos de 6 horas.

3. La lectura se realizó dentro del laboratorio de la cámara productores de leche donde se activó el hisopo, apretando firmemente el mango y girando hacia abajo desde la parte superior del hisopo. El mango se deslizó hasta que llegó al nivel de la parte inferior del tubo, el cual se activó y mezcló el reactivo (luciferina+luciferaza) con el ATP (adenosín trifosfato) recolectado en el hisopo, este se colocó dentro del aparato Novalum para obtener el resultado, el que aparece en la pantalla del luminómetro en Unidades Relativas de Luz (URL).

5.4.2.2 Evaluación higiénica de pezoneras mediante el hisopado de superficies.

Para la evaluación higiénica de pezoneras, con esta técnica la muestra se obtuvo después de la limpieza *in situ* del ordeño de la mañana al igual que con la otra técnica, en tiempos paralelos, para la toma de muestra se procedió de la siguiente manera:

1. Se utilizaron 4 hisopos esterilizados (autoclave) por finca, 4 pezoneras una sola vez. Los mismos se sacaron de la bolsa de papel, y se procedió al hisopado o frote en la parte interior de la pezonera.
2. Durante la toma de muestra se aplicó un poco de presión hacia abajo doblando ligeramente el hisopo para asegurar un buen contacto con la superficie de la pezonera, tomando así una muestra al igual que en la técnica anterior.
3. Se procedió a la siembra, colocando el hisopo dentro del caldo, que posteriormente se colocó en la hielera para su transporte hacia el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
4. Los tubos de ensayo, fueron debidamente identificados previo a su envío del laboratorio. Los resultados fueron anotados en el protocolo de cada una de las muestras.

5.5 Metodología obtención de variables

Los tratamientos evaluados fueron las técnicas de bioluminiscencia y el hisopado de superficies, donde cada muestra se tomó de la unidad de ordeño que está constituida por un recolector y cuatro pezoneras; se tomaron dos unidades de ordeño por finca.

En cuanto a las pezoneras de cada unidad de ordeño, dos pezoneras fueron utilizadas para la prueba de hisopado y las otras dos para la prueba de bioluminiscencia; las unidades de ordeños y pezoneras fueron elegidas al azar para cada tratamiento, esto porque la limpieza del equipo de ordeño fue *in situ*, lo cual significa que todo el equipo de ordeño es sometido al mismo método de limpieza en su momento.

Cuadro No 2

Límite de aceptación de los resultados en la evaluación del estado higiénico a nivel de pezoneras

Rangos a evaluar	UFC	URL
Aceptado	< 100	< 1500
Reprobado	>100	>1500

Fuente : COGUANOR (1993) y Charm Sciences Inc (2006)

En relación a la evaluación higiénica podemos observar en el cuadro 2 que según lo referido por la normativa COGUANOR (1,993), haciendo referencia por el autor Haars E, el rango máximo de presencia de UFC es de 100 en superficies de contacto y para la técnica de Bioluminiscencia es de 1500 URL referido por Charm Sciences Inc. (2006)

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Primera Etapa. Evaluación del método de limpieza

Cuadro 3

**Actividades de los métodos de limpieza en comparación con la normativa
COGUANOR NGO 34-234 No. 10**

Actividades	Si(%)	No(%)
Método de limpieza		
1. Realizan limpieza en el lugar después del ordeño	100	
2. Realizan un enjuague con agua fresca para eliminar cualquier residuo de leche	100	
3. Utilizan agua caliente a un 40 °C para eliminar todos los residuos		100
4. Al aplicar el detergente alcalino mantienen las temperaturas entre los 70 °C y 80 °C durante 20min.	33.33	66.67
5. Al aplicar el detergente ácido mantienen las temperaturas entre los 70 °C y 80 °C durante 20min.	33.33	66.67

Fuente: COGUANOR (1993).

Como se puede observar en el cuadro 3, los productores llevan a cabo dos de las actividades de limpieza en un 100%, mientras que la actividad tres los productores no la realizan, y el mismo es recomendado por el normativo COGUANOR NGO 34-324 (1993) para eliminar la presencia de residuos. Por último la actividad cuatro y cinco, los productores no aplican los detergentes ácidos y alcalinos a estas temperaturas ya que en su mayoría realizan uno de los dos lavados con agua caliente, como se observa el 66.67% aplican los detergentes con agua fría.

COGUANOR 34-234 (1993) en las Normas guatemaltecas obligatorias no indican que se deben aplicar los detergentes a bajas temperaturas y en el caso que el equipo presente daños por fisuras, rajaduras o grietas las cuales dificultan la limpieza, se recomienda que el proceso de desinfección para que sea adecuado se apliquen temperaturas altas durante suficiente tiempo para que el calor alcance a destruir microorganismos en el sitio contaminado, recomendando utilizar jabón o detergente alcalino a una temperatura de 100 °C o 105 °C y utilizar jabón o detergente ácido en un 75 °C o 80 °C para una desinfección adecuada.

Cuadro 4

Manejo de limpieza manual en comparación con la normativa COGUANOR NGO 34-234 No. 10.3.2

Manejo de mantenimiento	Si %	No %
6. Existen daños en las pezoneras	33.33	66.67
7. Cambian las pezoneras constantemente	50	50
8. Desinfecta las pezoneras entre vacas	16.6	83.4
9. Realizan lavado con agua y jabón en pezoneras	50	50
10. Sumergen en alguna solución de cloro o yodo la unidad de	16.6	83.4

ordeño		
11. Desarma el equipo para una limpieza manual y dejarlos bajo una solución detergente.	33.33%	66.67
12. Tienen depósito de agua para la sala de ordeño	100	
13. Realizan cloración de agua		100

Fuente: COGUANOR (1993).

En el cuadro 4 se expresa el manejo de mantenimiento para las salas de ordeño donde es de suma importancia el cambio de las pezoneras, como se puede observar el 50% de los productores realizan el cambio en menos de cuatro meses según la boleta de inspección que se aplicó, y el resto lo realizan cuando se presentan problemas físicos en las mismas, por lo que se observó durante la evaluación que solo el 33.33% de las fincas muestreadas presentaron daños en las pezoneras y del 66.67 % un 16.6% eran nuevas.

En cuanto a la limpieza de las mismas solo un 16.6% de las fincas sumergían las pezoneras en solución de cloro para su desinfección después del lavado in situ, y en un 50% realizaban un lavado manual con esponja y jabón espumoso. COGUANOR NGO 34-234 (1993) en su normativa expresa que se deberá enjuagar el equipo desmantelado en un recipiente apropiado que contenga una solución detergente donde se deberán cepillar todas las superficies, esto para evitar toda clase de residuos contaminantes.

En el 50% de las fincas muestreadas su principal fuente de agua provenía del pozo y en un 33.33% utilizan agua potable y el 16.6% restante utilizan agua proveniente del manantial, donde el 100% de los productores no realizan cloración de agua y solo un 16.6% tiene registros sobre la calidad de la misma. Como se observa en el cuadro 4, el 100% de las fincas tiene disponibilidad de agua para realizar la limpieza en la sala de ordeño.

Los resultados obtenidos en las boletas de inspección sobre la higiene del equipo de ordeño, observados en el cuadro dos y tres, se establece que lo referido por la normativa COGUANOR normativa obligatoria guatemalteca 34-234 del código de prácticas para la limpieza y desinfección en la industria de productos lácteos, no se cumple en su totalidad dicha normativa en las fincas muestreadas, porque desconocen el normativo COGUANOR y realizan únicamente lo que les han capacitado en su jornada laboral.

La diferencia entre los resultados de las fincas es alta, porque estas poseían diferentes clases de instalaciones, como espina de pescado, brete pasantes y tipo tándem por lo que los métodos de higiene del equipo de ordeño suelen variar, sin embargo existe el manejo adecuado el cual en las explotaciones lecheras lo desconocen así como también la normativa COGUANOR.

6.2 Segunda Etapa. Evaluación higiénica en pezoneras con la técnica tradicional y de bioluminiscencia por ATP

6.2.1 Análisis Estadístico

Al obtener ambos resultados se determinó el análisis descriptivo, por la naturaleza de los resultados. Los tratamientos a evaluar fueron dos técnicas:

Tratamiento 1: Bioluminiscencia obteniendo una dimensional expresada en Unidades Relativas de Luz.

Tratamiento 2: El hisopado de superficies que se expresa en Unidades Formadoras de Colonia.

Cuadro 5
Resultados obtenidos de la evaluación higiénica a nivel de pezoneras con la
técnica del laboratorio y bioluminiscencia

Finca	Pezoneras*	Hisopado UFC (Unidades Formadoras de Colonia)	Bioluminiscencia URL (Unidades Relativas de Luz)
1	A	100,000	42,690
	B	10,000	114,652
	C	0	98,855
	D	800	409,424
2	A	600	65,031
	B	400	34,624
	C	200	39,701
	D	500	43,971
3	A	1,600,000	91,393
	B	300,000,000	5,477
	C	0	14,618
	D	100,000	28,438
4	A	40,000	4,027,404
	B	20,000	6,448,518
	C	3,000,000	1,502,201
	D	4,000,000	7,112,690
5	A	300	54,584
	B	100	19,141
	C	90	97,527
	D	50	59,902
6	A	60,000	202,137
	B	30	30,094
	C	36,000	41,122
	D	40,000	7,044,788

*Las fincas muestreadas como se observa en el Cuadro 5 fueron 6, de las cuales se tomaron 4 muestras de pezoneras por finca, identificadas como A,B,C,D para cada una de las técnicas.

En el cuadro 5 se observan los resultados de ambas técnicas por fincas, donde se demuestra que no existe ninguna relación entre las técnicas, esto se debe a los distintos métodos de limpieza que utilizan en el equipo de ordeño, como los materiales que utilizan para efectuar el mismo, sin embargo en la finca dos y cinco se manifestaron resultados donde se mantuvo una relación entre ambas técnicas. Las diferencias obtenidas durante el estudio comparando las unidades formadoras de colonia con las unidades relativas de luz se atribuye que en algunas fincas las pezoneras eran nuevas, y el resto de las fincas no lo eran, por lo que los resultados entre las pezoneras por finca fueron variables.

En ese mismo cuadro se puede observar que la técnica de bioluminiscencia detectó presencias de contaminación por enzima del valor aceptado que es de 1500 URL, según Charm Sciences Inc. (2006) el tiempo de uso de las pezoneras también afecta en la lectura ya que el desgaste del material genera recuento de ATP que no corresponde a contaminación o por formación de Biofilm y por lo mismo varía entre fincas, por lo que podría atribuirse a que los resultados presentados sean altos.

Se observa que de acuerdo a la evaluación de la técnica de bioluminiscencia y la tradicional o de laboratorio se obtuvo presencia de contaminación en las pezoneras evaluadas con ambos métodos, ya que en esta clase de análisis es difícil encontrar un resultado cero pues estos no son medios estériles, a pesar que se obtuvieron dos datos con este resultado, se determinó que fue por la presencia del desinfectante en las mismas.

Los parámetros obtenidos demuestran que la técnica de bioluminiscencia es confiable para el monitoreo del estado higiénico en pezoneras ya que detectó la presencia de contaminantes, puesto que la misma es muy sensible ante la presencia de la molécula de ATP, por que los resultados también pueden llegar a detectar la presencia de jabón u otras sustancias.

Otros estudios realizados por Charm Sciences Inc. (2006) relatan que para conocer la presencia solo de microorganismos, se debe de realizar un análisis previo con la técnica de bioluminiscencia para detectar la presencia de ATP en jabones utilizados durante la limpieza como también un análisis al agua que se utiliza, esto con fines de conocer el valor real de ATP para los microorganismos presentes en la superficie de contacto.

Cuadro 6
Sensibilidad de la técnica de bioluminiscencia ante la presencia de microorganismos

Microorganismo Inoculados	UCF/100cm ²	Lectura (URL)
<i>E. coli</i>	1300	13411
<i>E. coli</i>	13000	140732
<i>Pseudomonas</i>	9000	63462
<i>Pseudomonas</i>	90,000	211386
<i>S. cerevisiae</i>	4	174
<i>S. cerevisiae</i>	41	9146
<i>S. cerevisiae</i>	410	22716
<i>S. cerevisiae</i>	4100	40392

Fuente: Charm Sciences Inc. (2006)

En el cuadro 6 se observa que en relación a la presencia de los microorganismos las presencias de adenosin trifosfato (ATP) y su lectura en unidades relativas de luz es mayor a los resultados de unidades formadoras de colonia (UFC).

En estudios realizados por Novalum y Charm (2006), explican que los medios nutritivos para cultivos que se utilizan para la inoculación a nivel de laboratorio, no detectan todos los microorganismos, presentes en un ambiente, por lo que no todos se desarrollan en estos medios nutritivos, en comparación a la técnica de bioluminiscencia que es más sensible ante la presencia de contaminación, y por ello en los resultados del estudio no existió dicha relación, por los medios externos que no se pueden controlar como en una inoculación a nivel de laboratorio.

VII CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó el presente estudio, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. La hipótesis que se planteó se acepta, demostrando que la técnica de bioluminiscencia es efectiva, por su facilidad y obtención de datos, a nivel de finca para el monitoreo de la presencia de contaminación en pezoneras.
2. La técnica de bioluminiscencia no evalúa la presencia de unidades formadoras de colonias bacterianas, por lo que se necesita de la técnica tradicional para determinar y conocer los agentes microbiológicos presentes en las pezoneras.
3. La técnica de bioluminiscencia no sustituye las pruebas microbiológicas, ya que esta técnica monitorea el estado higiénico de las superficies para detectar la presencia de contaminación.

VIII RECOMENDACIONES

En las condiciones en que se realizó el presente estudio, se hacen las siguientes recomendaciones.

1. Utilizar la técnica de bioluminiscencia para el monitoreo y evaluación higiénica en superficies de contacto a nivel de finca, por demostrar alta sensibilidad ante la presencia de agentes contaminantes como el poder realizar medidas correctivas en el momento de la evaluación.
2. Es necesario utilizar la técnica tradicional para determinar cuales son los agentes microbiológicos presentes en las superficies de contacto con productos lácteos.
3. Aplicar las buenas prácticas para ordeño, elaborando un manual y así mejorar las deficiencias encontradas en el trabajo.

IX RESUMEN

Raxón Solares. L L. 2011. Determinación de la confiabilidad de la técnica bioluminiscencia en la evaluación higiénica a nivel de pezonera, en comparación con evaluaciones microbiológicas de laboratorio. Tesis Licda. Zoot. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

El presente trabajo generó información sobre la nueva técnica de bioluminiscencia, recomendada para la evaluación y monitoreo de las superficies de contacto con los alimentos. El trabajo fue realizado en seis fincas asociadas a la cooperativa COOPROLECHE, la Cámara Productores de Leche de Guatemala (CPLG) y el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

En la fase experimental se comparó el método de limpieza y el cumplimiento de la normativa COGUANOR NGO 34-234(1993) con una boleta de inspección se procedió con la evaluación higiénica de pezoneras en salas de ordeño, con la técnica de bioluminiscencia, obteniendo las dimensionales Unidades Relativas de Luz (URL) y la técnica tradicional o de laboratorio con la dimensionales Unidades Formadoras de Colonia (UFC). Al obtener dichos resultados, se compararon con los límites aceptados por la Normativa COGUANOR NGO 34-234 para la técnica de laboratorio, donde el límite aceptado de Unidades Formadoras de Colonia es <100 y para la técnica de bioluminiscencia el parámetro internacional según Cham Sciences Inc. (2006) es <1500, Unidades Relativas de Luz para lo cual en el presente estudió las fincas evaluadas reprobó dicha evaluación ya que no cumplieron con los límites permitidos.

Se determinó que la técnica de bioluminiscencia es efectiva ante las evaluaciones higiénicas en pezoneras, por su alta sensibilidad ante la presencia de agentes contaminantes en comparación a la técnica tradicional, no obstante siempre se recomienda utilizar la técnica tradicional para determinar los agentes microbiológicos presentes en las superficies de contacto.

SUMARY

Raxón Solares. L L. 2011. Denotation of reliability of the bioluminescence technique in the hygienic evaluation at a milking machine level in comparison with microbiologic laboratory evaluations. Thesis; Bachelor in Zootechnics. Guatemala, Guatemalan University of San Carlos. Veterinary Medicine and Zootechnics' Faculty.

The present study generates information about the new bioluminescence's technique, recommended for the evaluation and observance of the surfaces of contact with nourishment. The study was performed in six farms associated with the COOPROLECHE Cooperative and the Guatemalan Milk Chamber Producers (Camara Productores de Leche de Guatemala, CPLG) and the Microbiology Laboratory of the Veterinary Medicine and Zootechnics' Faculty.

During the experimental phase, it was compared the cleaning method and the commitment by the normative COGUANOR NGO 34-234(1993) with a ticket of inspection and proceeded with the hygienic evaluation of milking machines in the milking chambers with the bioluminescence technique obtaining the Relative Light Units' dimensions (Unidades Relativas de la luz, URL) and the traditional technique or the laboratory's with the units' dimensions from the Founders of Colony (Unidades Formadoras de Colonia, UFC). Once the aforementioned results were acquired, those were compared with the accepted limits by the Normative COGUANOR NGO 34-234 for the laboratory technique, where the accepted limit of units from the Founders of Colony is <100 and for the bioluminescence technique, the international parameter according to Cham Sciences Inc. (2006) is <1500, Relative Light Units, for that matter in the present study, the farms evaluated failed the aforementioned evaluation since they did not accomplish the authorized limits.

It was determined that bioluminescence technique is effective in the presence of the hygienic evaluations in the milking machines, by its high sensibility during the presence of contaminant agents in comparison to the traditional technique, having

said that, it is recommended to utilize the traditional technique to determine the microbiologic agents present in the surfaces of contact.

X BIBLIOGRAFÍA

1. Carballo, J. 2001 Adherencias de bacterias a superficies de contactos con alimentos. *Alimentaria* 320: 19-24.
2. Carrera Klee, JS. 2008. Evaluación higiénica del equipo de ordeño a nivel de pezoneras y recolector de leche mediante la técnica de bioluminiscencia por ATP en fincas afiliadas a COOPROLECHE RL. Seminario I Lic. Zoot. Guatemala, GT/FMVZ 15 p.p
3. COGUANOR (Comisión Guatemalteca de Normas, GT). 1993. Código de prácticas para limpieza y desinfección en la industria de productos lácteos. Leche y productos lácteos. Norma: NGO 34 234. Guatemala. Ministerio de Economía. 92 p.
4. Control de contaminación - Ministerio de Agricultura e INIEA 2005. Boletín del Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria Lima, Perú. (en línea) Consultado 15 feb. 2009. Disponible en <http://www.inia.gob.pe/boletin/boletin0023/contaminacion%20de%20la%20leche.htm1>
5. Charm Sciences Inc. 2006 Manual Novalum. (en línea) Consultado 28 ene. 2011. Disponible en <http://www.charma.com>
6. Cruz S, JR. de la 1,982. Clasificación de Zonas de Vida a nivel de Reconocimiento. Guatemala Instituto Nacional Forestal. 42p.
7. David R. 2008 Manejo de calidad de leche en la sala de ordeño Universidad de la Florida (en línea) Consultado 12 feb. 2009. Disponible en <http://www.manejolechero.com/English/tabid/76/Default.aspx?tid=1&cid=12347&lid=1>
8. De Laval. 2008. Manejo de ordeño de una vaca (en línea) Consultado 13 feb. 2009. Disponible en http://www.delaval.com.ar/Dairy_Knowledge/Milking/Procedimiento_de_la_m%25C3%25A1quina_de_orde%25C3%25B1o.htm&usg=__wMoFdgfCu8RrUpl5esRnkPS5vr8=&h=496&w=579&sz=31&hl=es&start=10&um=1&tbnid=9YYGtLGFUj0RiM:&tbnh=115&tbnw=134&prev=/images%3Fq%3Dorde%25C3%25B1o%2B%2Bsalas%26um%3D1%26hl%3Des%26rlz%3D1T4ADBFB_esGT313GT314
9. _____ Limpieza en ordeño: Las 12 reglas de oro. 2008 (en línea) Consultado el 13 feb. 2009. Disponible en http://www.delaval.com.ar/Dairy_Knowledge/12_golden_rules.htm
10. Hayes, P. 1993. Microbiología e higiene de los alimentos. Zaragoza, ES, Acribia S.A 369 p.

11. Heer, G; Geotting, M. s.f. Evaluación del sistema de lavado alternado par equipos de ordeño según la calidad bacteriológica de la leche (en línea) Consultado 10 mar. 2009. Disponible en <http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/tecnologia/eche/informacion/evaluacion.pdf>
12. ICMSF (Internacional Comisión On Microbiological Specification For Foods US). 1991. El sistema de análisis de riesgos y puntos crítico. Su aplicación a la industria de alimentos. Zaragoza, ES. Acribia. 332.p
13. Ingalls, W. 2005 Procedimientos de la máquina de ordeño (en línea). Hombre, vaca y máquina trabajando en conjunto. Consultado 15 feb. 2009. Disponible en <http://images.google.com.gt/imgres?imgurl=>
14. OPS/OMS (Organización Panamericana De La Salud/ Organización Mundial De La Salud, IT). 1997. Limpieza y desinfección. (en línea) Consultado 20 de ene. 2009. Disponible en http://www.inppaz.org.ar/MENUPAL/INFTEC/FOS/catering/Capit_4.html
15. Páez, R et al. 1999. Bioluminiscencia en la limpieza de ordeñadoras Chacra. (en línea) Consultado 20 ene. 2009. Disponible en www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/anuario2001/a2001_30.htm - 46k
16. _____. 2001 Procedimiento de evaluación de la higiene de la ordeñadora, el equipo de refrigeración y la cisterna de transporte de leche mediante la técnica de bioluminiscencia (en línea). Argentina. INTA. Consultado 24 ene. 2009. Disponible en http://rafaela.inta.gov.ar/anuario2001/a2001_30.htm
17. Ponce de León, J. 1993. La máquina de ordeño y el tanque refrigerante, factores fundamentales para obtener leche de calidad para la industria. Industrias Lácteas Españolas. 169: 33-42
18. Stanley, W. 2002. Producing milk with a low bacteria count. NewGuide. Published by Cooperative Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources. University of Nebraska- Lincoln. G83-678-A: 1-8.
19. Técnicas de evaluación rápida de la eficacia de la limpieza y desinfección. 2005. (en línea) Bioluminiscencia. Consultado 20 ene. 2009. Disponible en http://www.axonas.com.ar/publicaciones/boletines_pdf/Septiembre01.PDF

XI ANEXOS

**BOLETA DE INSPECCIÓN
HIGIÉNE DEL EQUIPO DE ORDEÑO**

Fecha de Evaluación: _____

Información General:

Nombre de la Finca: _____

Nombre del Encargado: _____ Tel: _____

Localización de la Finca: _____

Fuente de agua: _____

<i>DESCRIPCION</i>	<i>SI</i>	<i>NO</i>	<i>OBSERVACIONES</i>
Métodos de limpieza			
1. Realizan limpieza en el lugar después del ordeño			
2. Realizan un enjuague con agua fresca para eliminar cualquier residuo de leche			
3. Utilizan agua caliente a un 40 °C para eliminar todos los residuos			
4. Al aplicar el detergente alcalino mantienen las temperaturas entre los 70 °C y 80 °C durante 20min.			
5. Al aplicar el detergente ácido mantienen las temperaturas entre los 70 °C y 80 °C durante 20min.			
Manejo de mantenimiento			
6. Existen daños en las pezoneras			
7. Cambian las pezoneras constantemente			Con que frecuencia:
8. Desinfecta las pezoneras entre vacas			
9. Realizan lavado con agua y jabón en pezoneras			
10. Sumergen en alguna solución de cloro o yodo la unidad de ordeño			
11. Desarma el equipo para una limpieza manual y dejarlos bajo una solución detergente.			Con que frecuencia:
12. Tienen depósito de agua para la sala de ordeño			
13. Realizan cloración de agua			
14. Llevan registros de calidad del agua			