



**UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA**

**"FRUCTUOSO RODRIGUEZ PEREZ"**

**CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA**

**DIVISION CIENCIA ANIMAL**

**GRUPO CENLAC**

Desarrollo y aplicación del sistema DIRAMIC en el control de la calidad bacteriológica de la leche cruda y pasteurizada.

*Tesis presentada en opción al grado científico de*

***Doctor en Ciencias Veterinarias.***

***Dr MV Juan Emilio Hernández García***

Tutor: Pastor Ponce Ceballos Dr C

Cotutor: Rolando Contreras Alarcón Dr C

La Habana

**1998**

**Dedicatoria:**

**A mis hijas y esposa**

A mis padres y hermanos

A la memoria de mi suegra

## Agradecimiento:

A mi tutor Dr. Pastor Ponce Ceballo quien me orientó metodológica y profesionalmente desde el inicio para mi formación como investigador y en la revisión y corrección del documento de tesis.

A mi cotutor Dr. Rolando Contreras Alarcón por haber confiado desde un inicio en mis ideas para el desarrollo y aplicación del sistema *Diramic* en el análisis de la calidad bacteriológica de la leche.

A la compañera Nuria Dávila y a todos los compañeros que en los laboratorios lácteos del país trabajaron con el sistema *Diramic* los cuales fueron participantes de los resultados presentados.

A los compañeros Arsenio Betancourt, Eleana Miranda, Francisco Farradá, Tomás Burgos y Roberto Faure por su colaboración en el análisis, procesamiento de los resultados y en la riqueza y actualización del documento.

A los Drs Eugenio Cisnero y Laudelina Felipe y a la Lic. Virginia Leiva por la revisión exhaustiva del documento y las múltiples sugerencias hechas.

A todos los trabajadores de la División Ciencia Animal por considerarme un miembro más del colectivo y constituir para mí el núcleo familiar que hizo de esta estancia una etapa inolvidable de mi vida.

A los miembros del Grupo *Diramic* del CENIC que me tienen como un compañero más dentro del mismo y muy en especial al Ing. Ivan Ramírez por su dedicación en el desarrollo y modificación del sistema para la etapa final del trabajo.

A todos los compañeros del CENSA desde los trabajadores de servicio hasta la alta gerencia por haberme asimilado como un trabajador más.

A la dirección de la Sede Universitaria Sancti Spiritus y a mis compañeros de trabajo por su apoyo.

A los amigos que me inspiraron optimismo.

A todos, muchas gracias

## Indice

INTRODUCCION 1

Objetivos generales 3

CAPITULO I REVISION BIBLIOGRAFICA I

1.1.-. Calidad de la leche cruda. Definición e Importancia 4

1.2.- Calidad de la leche cruda en el país 5

1.3- Importancia de la calidad microbiológica de la leche 7

1.4- Fuentes de contaminación de la leche 8

1.5- Pago de la leche por calidad microbiológica.

Criterios microbiológicos 8

1.6 - Tipos de microorganismos presentes en la leche cruda 9

1.6.1- Clasificación 12

1.7- Patógenos en leche 12

1.8- Tratamiento de la leche 15

1.8.1- Tipos de tratamientos térmicos de la leche 14

1.8.2- Contaminación bacteriológica de la leche pasteurizada  
y vida útil 15

9. Métodos rápidos para evaluar la calidad bacteriológica  
de la leche 16

1.9.1- Clasificación de los métodos rápidos de diagnóstico  
bacteriológico en leche 16

1. Métodos Directos 16

1. Enumeración directa de células 17

2-Conteo de unidades formadoras de colonias 20

1.9.2.2- Métodos Indirectos 21

1- Métodos que detectan la actividad metabólica 21

2- Métodos de detección de constituyentes celulares 29

3- Métodos que detectan productos finales del metabolismo 31

1.9.2.3- Métodos rápidos para detectar microorganismos patógenos.

1- Inmunoensayo 31

2- Otros 32

## CAPITULO II.

### Materiales y Métodos Generales 35

2.1- Origen de las muestras 35

2.2- Procedimiento para la toma de muestra 35

2.3- Procesamiento de las muestras y lectura 36

2.4. Método convencional de conteo en placa 36

2.5- Procedimiento de trabajo con el sistema Diramic 37

2.6- Procesamiento Estadístico 38

## PARTE EXPERIMENTAL

### CAPITULO III.

Utilización del sistema *Diramic* para la estimación del conteo total de bacterias en leche cruda. 40

Introducción y objetivos 41

#### Experimento 1

3.1- Desarrollo de la metodología analítica y establecimiento de los indicadores de calidad para el conteo total de bacterias en leche cruda 42

3.1.1- Materiales y métodos 42

3.1.2- Resultados y discusión 43

#### Experimento 2

3.2. Validación del sistema *Diramic* en la estimación del conteo total

de bacterias mesófila en leche cruda mediante estudio colaborativo

3.2.1- Materiales y métodos 49

3.2.2- Resultados y discusión 52

### Experimento 3

3.3- Utilización del sistema Diramic bajo condiciones de producción.

3.3.1- Materiales y métodos 61

3.3.2- Resultados y discusión 61

## **3.4. - Conclusiones del capítulo 62**

### Capítulo IV.

Desarrollo y valoración de la metodología de trabajo con el sistema

*Diramic* para su utilización en la detección de la contaminación postpasteurización en leche pasteurizada.

Introducción y objetivos 67

### Experimento 1

1. Determinación de la sensibilidad y parámetros de precisión de la metodología de trabajo con el sistema *Diramic*.

4.1.1.- Materiales y Métodos 68

4.1.2- Resultados y discusión 61

### Experimento 2

4.2. Aplicación de la metodología en la detección de la contaminación postpasteurización en plantas pasteurizadoras.

4.2.1- Materiales y métodos 79

4.2.2- Resultados y Discusión 80

### 4.3. Conclusiones del capítulo 84

CAPITULO V. DISCUSIÓN GENERAL 86

CAPITULO VI. Conclusiones y recomendaciones

Generales 92

Bibliografía.

### **Resumen**

En el presente trabajo se desarrolló y evaluó una metodología analítica aplicable al sistema *Diramic* (tecnología utilizada en la clínica médica del país), como método rápido para el diagnóstico bacteriológico de la leche cruda y pasteurizada. La parte experimental para la evaluación de la leche cruda incluyó estudios de validación a nivel de laboratorio y dos estudios colaborativos, con participación de cinco y ocho laboratorios, estos constituyen los primeros ensayos que de esta naturaleza se desarrollan en Cuba. Se encontró, en ambos casos, parámetros de precisión que se ajustan a los reportados internacionalmente para este tipo de método. En leche pasteurizada se definieron los parámetros para muestras de leche en norma y fuera de los parámetros de especificación. En la valoración del alcance del sistema para su uso en el país, se comprobó que en la clasificación de la contaminación bacteriológica de la leche cruda por niveles no hubo diferencias significativas con el método de conteo en placas y en la detección de la recontaminación en leche pasteurizada; la sensibilidad fue superior al 90% y las muestras se concentraron en el intervalo de mayor sensibilidad del sistema. Se concluye que la metodología desarrollada es aplicable en nuestras condiciones de producción; se recomienda el empleo del sistema *Diramic* con las metodologías desarrolladas como método rápido para el conteo de bacterias totales y coliformes en leche cruda y pasteurizada.

### **INTRODUCCION.**

La leche constituye un producto de suma importancia para la alimentación humana, con una gran repercusión en la nutrición de niños y ancianos. En la actualidad su demanda crece a nivel internacional favorecido por razones económicas, fisiológicas, nutricionales, credos filosóficos y sentimientos. Para cubrir esa demanda no sólo se necesita de una determinada cantidad mínima definida por la FAO en 150 l/persona/año sino también de una correcta calidad higiénico sanitaria.

En la práctica es imposible obtener la leche estéril y al constituir la misma un medio de cultivo natural para el desarrollo de los microorganismos siempre habrá una contaminación inicial que estará asociada con las características de los animales y su manejo, el ambiente en que se obtiene y el personal encargado del ordeño (Wolters y Boesekamp, 1996, Slaghuis, 1996, Heeschen, 1996). El desarrollo de la contaminación bacteriana en la leche tiene gran repercusión para la industria láctea dada su implicación tecnológica, económica y social. La microflora contaminante produce enzimas termoestables capaces de provocar cambios en los componentes mayoritarios de la leche fundamentalmente en las proteínas y las grasas que repercuten a su vez en los procesos de fabricación, en las características organolépticas, estabilidad y vida útil de los productos finales. Un conteo alto de microorganismos en la leche cruda obligando a una higienización más constante y profunda en la fábrica teniendo una mayor probabilidad de presencia simultánea de bacterias perjudiciales para la salud de los consumidores. Dentro de los indicadores de la calidad de la leche el nivel de contaminación bacteriana es el más dinámico y de mayor variación en un corto periodo de tiempo y por ello su determinación esta incluida en los diferentes sistemas de pago al productor (Flower, 1998).

Los métodos de análisis para evaluar la calidad higiénico sanitaria de la leche han evolucionado sustancialmente desde la década del 60, cuando se utilizaba esencialmente criterios simples como el lactofiltro, la acidez titulable y las pruebas de reducción de colorantes, pasando posteriormente por los métodos convencionales de conteo en placa. Sin embargo este método, universalmente conocido tiene aspectos limitantes como es el excesivo tiempo en su realización, amplia laboriosidad y utilización de gran cantidad de medios de cultivo, placas y otros insumos (Bumgart, 1996, Tejedor, 1998).

El desarrollo de métodos rápidos y/o automatizados en el diagnóstico de la calidad higiénico sanitaria de la leche y sus productos constituye en los últimos años una necesidad bajo las nuevas concepciones de calidad y de comercialización que predominan en este sector, enfocado en lo fundamental en la obtención de la respuesta en el menor tiempo posible para tomar las medidas correctivas sobre las posibles brechas en la higiene de algunas de las fases de la cadena productiva antes de que el producto sea liberado al mercado (Reibroeck, 1996, Bishop, 1998).

Una medida importante en la extensión de la vida útil de la leche cruda es su pasteurización, aunque las temperaturas establecidas para el proceso no logran eliminar la totalidad de los microorganismos presentes. Los microorganismos termorresistentes, y los originados por la contaminación postpasteurización forman la flora de la leche pasteurizada. Este último tipo de contaminación tiene la mayor importancia en la vida útil de este producto (Muir, 1996, White, 1998). En Cuba la situación con el control de la calidad de la leche y sus derivados adolece de múltiples problemas, debido esencialmente a las limitaciones en la adquisición de medios de cultivo para el método convencional de conteo en placa, la utilización de métodos de reducción de colorantes como el azul de metileno que tiene demostradas limitaciones, fundamentalmente cuando se trata de leche refrigerada, falta de automatización en los laboratorios

lactológicos y limitadas posibilidades de reclamos por parte del consumidor (Ponce 1998).

Todo ello reduce considerablemente la capacidad de control de la calidad higiénico sanitaria de la leche ya sea para el pago, el control de los procesos industriales y en el ejercicio de un efectivo control estatal de la calidad de la materia prima y/o productos terminados. Esta situación es común para muchos países del tercer mundo que tienen necesidad de mejorar su capacidad competitiva en el mercado del sector lácteo tanto a nivel interno como en el mercado internacional, pero presentan una capacidad disminuida para aplicar sistemas efectivos de control de la calidad de la materia prima y los derivados lácteos (OPS, 1994).

Por otra parte, los equipos con tecnologías analítica de avanzada existentes en el mercado internacional son altamente costosos y por tanto, difíciles de adquirir para el trabajo de rutina de la industria, productores y otros sectores relacionados con el tema. Para Cuba el desarrollo u obtención de sistemas analíticos para estimar la contaminación bacteriana de la leche cruda y pasteurizada integradas a sistemas automatizados de análisis constituyen una necesidad para los programas de modernización del sector lechero nacional, en el empeño de alcanzar mayores niveles de calidad de la materia prima y sus derivados y seguridad de los consumidores.

En la clínica médica del país se utiliza un sistema (*Diramic*) que permite medir de forma rápida y con suficiente sensibilidad, los cambios de turbidez que se producen en medios de cultivo en estado líquido estando relacionados con infecciones urinarias y la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos (Contreras, 1995). El principio de medición del sistema es la turbidimetría que se ha utilizado para el cálculo aproximado del contenido total de microorganismos en preparaciones de inóculos y también como parte de otros sistemas automatizados.

Una condición en el desarrollo de estos sistemas es el establecimiento de una relación directa cualitativa o cuantitativa entre los cambios físicos generados por el crecimiento de los microorganismos y la estimación de estos por los métodos estándar de conteo en placa u otros similares.

El basamento analítico del sistema *Diramic* da la posibilidad de utilizarlo en el análisis de la calidad higiénico sanitario de la leche, sin embargo actualmente no se dispone de una metodología de trabajo aplicable en este campo de análisis, especialmente en la leche fluida (cruda y pasteurizada) debido a las complejas características físico química de este alimento y a las diferencias con relación al nivel y tipo de contaminación microbiana. El estudio de las múltiples variables hacen necesario el desarrollo de una metodología propia relacionada entre otras con las características ópticas del producto, los medios de cultivos, aspectos operacionales del sistema, nivel de contaminación y otras, ajustadas a los parámetros que se establecen para estas mediciones en el ámbito internacional y posibiliten una solución científica a este problema.

Partiendo de las premisas se establecen los siguientes **objetivos generales**:

- Desarrollar una metodología de trabajo que permita registrar los cambios turbidimétricos en la leche cruda y pasteurizada utilizando la tecnología básica del sistema **Diramic** y valorar su relación con el nivel de contaminación bacteriana.
- Evaluar los parámetros de calidad de la metodología desarrollada y determinar el alcance del sistema bajo condiciones de producción en la estimación del nivel de contaminación bacteriana de la leche cruda y pasteurizada.

## **CAPITULO I**

### **REVISION BIBLIOGRAFICA**

#### **1.1.Calidad de la leche cruda. Definición e Importancia**

La leche se ha conceptualizado desde diferentes puntos de vista (dietética, física, química, económico, biológico y otros), no obstante en la mayoría de las legislaciones consideran los siguientes elementos en su definición legal: Leche, sin otra denominación, es el producto integro y fresco del ordeño completo de una o varias vacas sanas, bien alimentadas y en reposo, exento de calostro y que cumpla con los caracteres físico-químicas y bacteriológicas que se establecen (FAO, 1981). Más recientemente le han incorporado definiciones tales como leche para queso, productos fermentados y otros (CEE, 1992, Ramírez, 1994, FAO-OMS, 1996).

La leche es el alimento más completo que se encuentra en la naturaleza y tiene grandes posibilidades industriales para obtener diversos productos para la alimentación humana, industria farmacéutica y otros (Clavijo 1991, Ruvalcaba, 1994, Mardones, 1994). Tradicionalmente se aceptaba que la leche estaba constituida por más de 100 componentes, pero con el desarrollo de técnicas analíticas actuales, se estima constituida por más de 2,000 moléculas diferentes, no obstante, los principales componentes de la leche son el agua, lactosa, grasa, proteínas, vitaminas y sales minerales (Meyer, 1988, Ruvalcaba, 1994, Ponce y Capdevilla, 1997).

Inicialmente el concepto de calidad de la leche cruda involucraba los requisitos que deberían cumplir a los fines de su utilización por la industria. (Clavijo, 1991, Alcaraz et al, 1996). Actualmente, la definición de la calidad evolucionó a un criterio más amplio, que engloba la ausencia o en niveles de tolerancia las

sustancias perjudiciales para el consumidor (pesticidas, medicamentos, micotoxinas, sustancias radioactivas); presencia de escaso contenido de gérmenes, para obtener productos con prolongada capacidad de conservación; caracteres organolépticos adecuados; escaso contenido celular como expresión de una composición normal sin alteración por mastitis y trastornos secretores; resistencia a períodos prolongados de almacenamiento; escasa presencia de gérmenes indeseables, especialmente coliformes y esporulados (psicrotrofos) y por último una normal composición bioquímica (proteína, grasa, lactosa, vitaminas, etc.). El aseguramiento de la calidad de la leche involucra además a todos los factores del proceso que van desde la producción en la unidad hasta el procesamiento en la planta y distribución al consumidor (CEE, 1992, Stauffer, 1993, Rampone y Giraud, 1996<sup>1</sup>, Heeschen, 1996, Rampone y Giraud, 1996<sup>2</sup>, Fuhrmann, 1998).

La calidad de la leche puede medirse de muchas maneras distintas; no obstante los indicadores que se usan con mayor frecuencia en países de ganadería desarrollada son reflejados en la tabla 1 (Philpot, 1996, Heeschen, 1996, IDF, 1995). Sin embargo en América Latina aún los enfoques relacionados con la calidad no constituyen un factor de peso, excepto en aquellos países y empresa líderes en el continente (Ponce, 1998).

## **1.2- Calidad de la leche cruda en el país**

En 1961 fueron creados en nuestro país los departamentos de servicio agropecuario con el objetivo de trabajar en función de incrementar los niveles de acopio de leche para disminuir las importaciones e implementar las medidas técnicas que permitieran alcanzar un mejoramiento de la calidad. Desde entonces y hasta 1989 el acopio de leche osciló entre los 213 millones de litros de leche en 1962 a 761 en 1989, reduciéndose en los años resientes asociado a la crisis económica del país.

La recolección de la leche se realiza tanto en camiones como en cántaras y otros envases, por tal razón el sistema de pago establecido es basado en un muestreo en vaquería de al menos 2 muestras al mes teniendo como criterio para ello los resultados de la prueba de reducción del azul de metileno (TRAM) y el nivel de grasa, incluyéndose penalizaciones por aguado y presencia de mastitis. Existen tres categorías bacteriológicas estimadas por el TRAM:  $\geq$  5:30 horas,  $\geq$  4:30 horas y  $\geq$  de 3:30 horas.

Desde el punto de vista bacteriológico el 42% de la leche que se acopió por la industria en 1989 redujo el azul de metileno en más de 3 horas y media, mientras que 1992 alcanzó valores de un 18% y en 1997 sólo fue de un 1%, influyendo fuertemente en este descenso los cambios tecnológicos en las prácticas de manejo e higiene del ordeño, limitaciones en productos higienizantes y una reducción sustancial en el uso de equipos de enfriamiento en las vaquerías, por lo que el nivel de leche enfriada descendió de un 66% a un 25%. Actualmente se observa un proceso de recuperación paulatina en dichos indicadores (Ponce, 1998).

Tabla 1. Principales indicadores para evaluar la calidad de la leche (IDF, 1995, Philpot, 1996, Hesschen, 1996)

INDICADOR DE CALIDAD	VARIABLES
Organoleptica	Olor Sabor Color
Composicional	<b>Grasa (ácidos grasos) (pp)</b> Proteínas (caseinas, proteína bruta, NNP) (pp) Lactosa Sólidos Totales Sólidos no grasos (SNG) Cenizas Densidad
Higiénica Sanitaria	Conteo total de bacterias (pp) Gérmenes Butíricos Lipolisis Otros Bacterias Termodúricas Bacterias Psicrotrofas E.coli y Coliformes Patógenos emergentes ( <b><i>Salmonella spp</i></b> , <b><i>L.monocytogenes</i></b> ) Conteo de Células Somáticas (pp) Inhibidores (pp) Contaminantes (Plaguicidas, metales pesados, micotoxinas-aflotoxinas).

Otros	Temperatura (pp)
	Acidez
	Punto crioscópico ( pp)
	Sedimentos

Leyenda :pp-principales indicadores tomados para el pago composicional e higiénico de la leche

### 1.3- Importancia de la calidad microbiológica de la leche

La complejidad bioquímica de la leche en su composición y su elevada actividad de agua la convierten en uno de los alimentos naturales donde proliferan fácilmente la mayor parte de los microorganismos y bien se podría catalogar como un medio universal de cultivo (Martínez et al, 1992, Alcaraz et al, 1996).

La presencia de microorganismos en la leche tiene varias orientaciones. Unos son beneficiosos por las transformaciones favorables que producen y otros son perjudiciales (Vasavada,1993). Su control presenta aspectos sanitarios y comercial, el primero se refiere al riesgo que el alimento puede suponer para la salud del consumidor cuando es portadora de microorganismos patógenos o de sus toxinas y el segundo a las características de conservación de la misma que viene determinada por la presencia de un mayor o menor número de la flora saprofítica, ésta en elevadas concentraciones (entre  $10^6$  y  $10^8$  ufc/mL) puede producir defectos y disminución de las propiedades nutritivas y organolépticas del producto (Heeschen,1996).

Las bacterias saprofíticas son consideradas como gérmenes indicadores, considerándose en la industria láctea los siguientes grupos:

- a. Bacterias aeróbicas mesófilas (en casos especiales se pueden determinar bacterias anaerobias mesófilas, bacterias psicrófilas y termodúricas).
- b. Coliformes totales y fecales
- c. Enterobacterias totales
- d. Enterococos.

En la vigilancia o control sistemático de la calidad bacteriológica de la leche cruda y pasteurizada se utilizan fundamentalmente los indicadores a) y b). Este último grupo (Coliformes) en las normas tanto cubanas como extranjeras de la leche cruda y pasteurizada permite valorar la calidad sanitaria sin necesidad de definir si la contaminación es o no fecal. Ambos grupos revelan un manejo inadecuado desde el punto de vista higiénico de la leche, cuando sobrepasan ciertos límites numéricos (NC-38-02-07, 1997),  $1 \times 10^6$  ufc/mL en el grupo a) y  $10^2$  ufc/mL en el grupo b), la presencia de bacterias coliformes se asocia además con la probabilidad de que se introduzcan en la leche microorganismos peligrosos sanitariamente (patógenos o toxigénicos), constituyendo en ambos casos una desventaja económica para cualquier industria (Vanos, 1991, Siva et al, 1993, Murphy y Boor, 1998).

Estos grupos de microorganismos ha permitido la introducción de cambios en las estrategias de muestreos, pruebas de almacenamientos y modelaciones predictivas para simular o desarrollar métodos que puedan conocer que pasará con el alimento durante su procesamiento, distribución y manipulación, (Kramer y Holzapfel, 1994, Notermans y Veld, 1994, Baird Parker, 1995, Chang, 1998).

#### 1.4- Fuentes de contaminación de la leche

La leche es un producto natural cuyo origen en la glándula mamaria es normalmente estéril o con muy baja carga bacteriana pero en la práctica es difícil mantener esas condiciones y la contaminación siempre va a estar presente, al ser obtenida de la ubre de la vaca (Saubidet, 1996). Las fuentes de contaminación pueden ser internas o externas (Bae, 1992, Martínez et al, 1992, Martínez, 1993, Wolters y Boesekamp, 1996, Slaghuis, 1996). Las fuentes de contaminación interna en los animales con ubres sanas serían los microorganismos presentes en la cisterna y el canal del pezón. En otros casos estarían relacionado los microorganismos productores de infecciones orgánicas y de las ubres con mastitis clínica y subclínica, constituyendo la leche una de las vías a través de la cual es excretado el germen (Heeschen, 1996).

La contaminación externa de la leche cruda está asociada a varias fuentes dentro de las que pudiéramos citar: **El animal**: piel, heces, orina, pelos, lesiones, ect., **el personal** que manipula la leche, **entorno de las vacas, agua contaminada, limpieza deficiente del equipo de ordeño, mala higiene de los recipientes (cántaras, tanques de frío) y camiones cisternas** que transportan la leche (Charles et al 1982, Hunter et al, 1983, Maohieu, 1991 Bae y Seung, 1992, Patel, et al, 1993, Siva y Sannabhadti, 1994). Para limitar el papel de estas fuentes tiene mayor prioridad la preparación de la ubre, limpieza y desinfección del equipo de ordeño y utensilios y un correcto almacenamiento, influenciado todo ello por el ambiente en que se desarrollan los animales (Ren et al 1991, Bertilsson, 1996, Giffel, 1996, Summer, 1996, Slaghuis, 1996).

#### 1.5- Pago de la leche por calidad microbiológica. Criterios microbiológicos

La calidad higiénica es un elemento muy importante para el pago de la leche, siendo uno de los parámetros de mayor exigencia en las legislaciones de cada

país (De Jon, 1994). Este criterio redundante en un progreso neto de la calidad bacteriológica de la leche entregada a la industria por los productores cuando se une a sistemas con premios y/o castigos (Van Den Berg, 1987, Weill, 1994, Raciti y Vagliante, 1996, Giraudo et al, 1996, Fuhrmann, 1998, Rampone y Giraudo, 1996).

Los parámetros microbiológicos para definir la calidad de la leche varía de un país o bloque económico a otro, estando en función del desarrollo del sector lácteo, posibilidades económicas y exigencias de los consumidores (Tabla 2, y 2A), observando en la mayoría de los países de ganadería desarrollada que la leche acopiada para la industria tiene conteos de bacterias totales entre los niveles de  $2 \times 10^4$  -  $3 \times 10^5$  ufc/mL o menos (IDF, 1995, González et al, 1998, Murphy, 1998), mientras que en los países de menos desarrollo aunque tienen criterios semejantes, en la práctica se encuentran conteo más elevados (Beloti et al 1998<sub>1</sub>).

Tabla 2. Criterios microbiológicos para la clasificación de la leche según conteo de ufc/mL (IDF 1995, FEPAL, 1997)

Países	Grados de clasificación (conteo total de bacteria x 1000)						Frecuencia	
Australia	-20	20-50	+50				50	2-4xmes
Austria	-100	100-300	300-600	600-1000	+1000			2xmes
Bélgica	-100	100-300	300-400	1x +400	2x +400	3x +400		2xmes
Canadá	-50	50-75	+75				100	1xmes
Checoslovaquia	-100	100-300	300-800	800-2000			800	
Alemania	-100	100-400	+400					2xmes
Dinamarca	-30	30-100	100-300	+300			400e2	Semanal
Francia	-50	50-100	100-300	+300			500	3xmes
Finlandia	-50	50-100	100-250	+250			500	2xmes
UK	-20	20-100	+100				200	Semanal
Irlanda	-30	30-50	50-100	100-250	250-500		500	2xmes
Israel	-40	40-100	100-250	250-500	+500			3xmes
Japón	-300	+300					1000	1xmes
Holanda	-100	100-250	250					1x2sem
Nueva Zelanda	-25	25-50	50-100	100-200	200-500	+500		1x10d
Noruega	-30	30-80	80-300	+300			300	3xmes
Polonia	Reductasa: positivo o negativo							2xmes
SurAfrica	-50	50-200	200-300	+300			300	3xmes
Suiza	-100	100-300	+300					2xmes
EUA	-25	+25					300	1xmes

Tabla 2A. Continuación. Países de América

Países	Grados de clasificación (conteo total de bacteria x 1000)							Frecuencia
Costa Rica	-100	100-400	400-800	800-1200	+1200			2-3 x mes
Uruguay	-100	+100						2-3 x mes
Brasil	10	500	1000					2-3 x mes
Paraguay	8 h	4-5.5h	2-3.5h	1-5h	Reductasa (hrs)			
Chile	-250	250-500	+500					2-3 x mes
Argentina	100	250-500	500-800	+800				2-3 x mes
Guatemala	200	200-1000	+5000					2-3 x mes
México	150	+150						2-3 x mes
Panamá	200	200-1000	+1000					2-3 x mes
Cuba	+5.30	4.30 - 5.30	3.30 -4.30 Reductasa (hrs)					

El muestreo de la leche con el objetivo de la evaluación de la calidad higiénica sanitaria lleva implícito el poder contar con una muestra lo más representativa posible del producto a fin de que los resultados obtenidos a partir de los análisis se correspondan con la realidad objetiva, constituyendo un dato de suma importancia al definir una valoración económica en los sistemas de pago basados en la calidad de la leche. Las pruebas diarias para conocer la calidad bacteriológica de la leche no se justifican económicamente, de aquí que las mismas puedan ser tomadas a intervalos irregulares en función de las posibilidades y propósito del productor y/o industria; generalmente se hacen de 2-3 por mes, con sus extremos de 1 y 4 (Ibarra, 1996, Speranza et al, 1996, González, 1996).

#### 1.6- Tipos de microorganismos presentes en la leche cruda

El número y tipos de microorganismos en la leche inmediatamente después de ordeñada (microflora inicial), reflejan la contaminación bacteriana durante la obtención de la misma (Tabla 3 y 4), no obstante, no existe perfecto acuerdo en el tipo de flora de la leche recién ordeñada, haciendo abstracción de la patología que pudiera tener el animal, en general suelen ser cocáceas, no termodúricos, incluyendo *Staphylococcus* y *Streptococcus*; estas son bacterias presumiblemente de origen mamario (Cousins y Banley, 1981, Alanis de la O et al, 1994, Ryser, 1998). Cuando la población bacteriana se eleva, la proporción cambia y generalmente se incrementan los bacilos Gram negativos (BGN), (Heeschén, 1996).

Tabla 3. Aporte de especies bacterianas de las fuentes de contaminación de la leche (Cousins y Banley, 1981, Heeschén, 1998, Ryser, 1998).

Glándula mamaria sana	<i>Micrococcus, Staphylococcus, Bacillus, Enterobacterias y Pseudomonas, Lactobacillus, Leuconostoc</i>
Glándula mamaria mastítica	<i>Staphylococcus, Streptococcus, Corynebacterium, Coliformes</i>
Exterior del animal	Psicrotrofos, termodúricos y bacterias coliformes
Medio ambiente	Microorganismos esporulados, <i>Listerias, Enterobacterias</i>
Agua de lavado de equipo	<i>Salmonellas, Coliformes, Pseudomonas</i>
Máquina de ordeñar no higiénica	<i>Coliformes, Aerobacter</i> y termodúricos
Utensilios, Carros lecheros, Equipos de frío	Gérmenes termodúricos y psicrotróficos
Operarios	Contaminantes ambientales más patógenos en individuos afectados

Tabla 4. Tipos de microorganismos mesófilos aeróbicos en leche cruda fresca (Cousin y Banley 1981).

Micrococcos	Streptococcus	Bacilos Gram (+) asporogenos	Formadores de esporas	Bacillus Gram (-)	Miscelánea
-------------	---------------	---------------------------------	--------------------------	----------------------	------------

Micrococcos spp	Enterococcos spp	Microbacterium spp	B.subtilis	Pseudomona spp	Levaduras Mohos
Staph spp	Strep.de la mastitis	Corynebacterium spp	B.cereus	Acinetobacter spp	Streptomices
		Artrobacter spp	B.liquefasciens	Flavobacteriu spp	
		Kurthia spp	Cl.perfringes	Enterobacteri spp	
				Klebsiella spp	
				Aerobacter spp	
				Escherichia spp	
				Serratia spp	
				Alcaligene spp	

El recuento inicial de mesófilos totales estará en el rango de  $1 \times 10^3$  ufc/mL si la contaminación interna es mínima, bajo condiciones higiénicas adecuadas durante el ordeño pueden encontrarse niveles de  $1 \times 10^4$  ufc/mL. Con refrigeración a  $4^\circ\text{C}$  este número de microorganismos puede ser mantenido en el rango de  $10^4$  a  $10^5$  ufc/mL (Heeschen, 1996), cuando aparecen más de  $1 \times 10^6$  ufc/mL ya la contaminación es grosera, sin embargo, esta última es la situación existente en la mayoría de las unidades del país (Cabrera y Lamazares, 1997, González et al, 1998).

### 1.6.1- Clasificación

La flora bacteriana de la leche se ha clasificado en diversas formas, dependiendo de la orientación que persigue el autor. Considerando el papel del veterinario como higienista de alimentos la división en microorganismos saprofíticos y patógenos para el hombre es muy útil, así como la ubicación fisiológica de los contaminantes respecto a las temperaturas que normalmente se utilizan en la manipulación y procesamiento de la leche (Psicrotrofilos y

Termodúricos, Tabla 5), ya que juegan un papel muy importante en la obtención de productos de alta calidad (White, 1993).

Tabla 5. Bacterias Psicrófilas Gram negativas y termodúricas en leche cruda. (Mc Guiggan et al, 1994, Muir et al. 1996, Giffel et al, 1996).

Bacterias Psicrótróficas	Bacterias temodúricas
<i>Pseudomonas fluorescente</i>	Micrococcus
<i>Pseudomonas no-fluorescente</i>	Microbacterium
<i>Enterobacterias, Aeromonas, Pasteurella, Vibrio</i>	Bacillus
<i>Acinetobacter, Moraxella o Brucella</i>	Streptococcus
<i>Flavobacterium</i>	Brevibacterium
<i>Chromobacterium</i>	Lactobacilos
<i>Alcaligenes</i>	

Los microorganismos patógenos no tienen una gran significación sobre la vida útil de la leche cruda y pasteurizada, este rol es jugado fundamentalmente por las bacterias saprofitas, muchos de ellos sensibles al calor las cuales crecen y eventualmente degradan la leche cruda durante el periodo inicial de almacenamiento (psicrótrofos) y son los gérmenes más frecuentes en la contaminación postpasteurización. A este grupo de microorganismos se le ha dado en las últimas décadas la mayor importancia a pesar de ser termolábiles porque los mismos son capaces de crecer con relativa rapidez y producir enzimas lipolíticas y proteolíticas termoestables que pueden causar enranciamiento y descomposición de las grasas, así como ocasionalmente formación de gel. Estos resultados se ponen de manifiesto cuando el conteo está por encima de  $1 \times 10^6$  ufc/mL (Muir, 1996<sub>1</sub>, Reinheimer, 1996). El otro grupo importante es el de los microorganismos termodúricos que resisten la pasteurización (Alcolado et al, 1989, Pesic, 1991, Mc Guiggan et al, 1994, Giffel et al, 1996).

Los microorganismos saprofitas de la leche pueden agruparse además por la actividad que tienen sobre sus principales constituyentes (Bae y Seung 1992, Jay 1992, Hesschen, 1996) pudiendo ser: Glicolíticos (Ej. *Streptococcus* y *Lactobacillus*), proteolíticos (Ej. *Pseudomonas*, *Enterobacterias*, esporógenos

aeróbicos) y lipolíticos (Ej. *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Aeromonas*, *Corinebacterias*).

### 1.7- Patógenos en leche

La seguridad de la leche como alimento ha sido un tema muy debatido en la industria láctea moderna (Kramery Holzapfel, 1994, Notermans y Veld, 1994, Bair Parker, 1995), no obstante, la frecuencia de aparición de casos de toxiinfecciones vehiculizadas por la leche se ha incrementado en los últimos años. Los casos reportados están asociados generalmente con el consumo de leche cruda o con prácticas inadecuadas de la leche postratamiento (Solodovnikov et al 1996, Djuretic et al, 1997, Flower, 1998). Los patógenos más significativos encontrados en leche cruda y productos lácteos se muestran en la tabla 6, reflejándose además la habilidad de los mismos para crecer a temperatura de refrigeración y la supervivencia a la pasteurización.

Los microorganismos patógenos productores de toxiinfecciones alimentarias pueden ser controladas por la pasteurización y buenas prácticas de higiene, pero donde el tratamiento no es aplicado o este se hace incumpliendo las normas establecidas ya sea de una forma consciente o inconsciente podría constituir riesgos importantes para la salud pública, a pesar de que ello pudiera ser moderado manteniendo el producto a bajas temperaturas (Bisop, 1995, Andrews 1995, Hahn, 1996).

Tabla.6 Principales patógenos en leche. (Res et al, 1992, Bisop, 1995, Andrews, 1995, Hesschen, 1996, Muir, 1996, Hahn, 1996).

Microorganismos	Crecimiento a 6°C	Supervivencia a la Pasteurización.
<i>Staphylococcus aureus</i>	NO	NO
<i>Campylobacter jejuni</i>	NO	NO
<i>Clostridium spp</i>	NO	SI (ESPORAS)
<i>Salmonella spp</i>	NO	NO
<i>Escherichia coli</i>	NO <sup>b</sup>	NO
<i>Yersinia enterocolítica</i>	SI	NO
<i>Bacillus cereus</i>	SI	SI (ESPORAS)
<i>Listeria</i>		

<i>monocytogenes</i>	SI <sup>c</sup>	NO
<i>Brucella spp</i>	NO	NO
<i>Mycobacterium spp</i>	NO	NO
<i>Coxiella burnetii</i>	NO	NO
<i>Virus</i>	NO	NO

**a** Tratamiento al calor a 72°C por 15 segundos

**b** algunas cepas no proteolíticas pueden crecer a menos de 6°C

**c** solamente ciertas cepas

## 1.8- Tratamiento de la leche

El método más efectivo para reducir el número de bacterias en la leche es aplicando el tratamiento térmico, su eficacia está determinada por la combinación de la temperatura de calentamiento y el tiempo. La necesidad del tratamiento térmico de la leche para la comercialización tuvo su inicio a finales del siglo pasado, dado en lo fundamental por la necesidad de trasladar la leche fluida a largas distancias sin que constituyera un riesgo para la salud pública y a la vez se mantuviera con la calidad adecuada.

### 1.8.1- Tipos de tratamientos térmicos de la leche

La temperatura influye en forma selectiva sobre el crecimiento de los microorganismos de la leche y para destruirlos totalmente se necesitan temperaturas muy drásticas, las cuales comprometen la calidad del producto, fundamentalmente su olor y sabor, así como elementos estructurales que al final repercuten en la eficiencia del procesamiento industrial.

Normalmente se reconocen cuatro categorías de calentamiento térmico de la leche, sin embargo su distinción es ignorada en algunos casos. El tratamiento más moderado con efectos prácticos significativos es el llamado **termización**. (Muir, 1996<sub>2</sub>), no obstante, la aplicación más amplia del tratamiento para productos lácteos es la **pasteurización**. Correctamente aplicada, la pasteurización logra una destrucción casi completa de las bacterias patógenas en la leche y reduce la mayoría de los saprófitos a niveles que no constituye un riesgo para el producto y también alarga la vida útil (Santos, 1987, FAO-OMS, 1996, Greubel, 1997).

Hay dos tipos de tratamiento térmicos dentro de la pasteurización: uno donde la leche es calentada manteniendo una temperatura entre 62.8°C y 65.6°C durante 30 minutos y después enfriada a 6°C y en el otro la leche es mantenida por encima de 71.7°C al menos 15 segundos (HTST) e inmediatamente enfriada a 6°C (Beloti et al, 1998).

La efectividad de la pasteurización es monitoreada por análisis enzimáticos y bacteriológicos. Las pruebas son satisfactorias si después de la pasteurización de la leche la fosfatasa es inactivada y el efecto bactericida es superior al 99 % (Mc Kellar et al, 1994).

Otro tratamiento es logrado al mantener la leche entre **105°C y 110°C de 30 a 45 minutos**, pero el mismo tiene poca aceptación por alteraciones que provoca al producto, no ocurriendo así con la **ultrapasteurización (UHT)** o UAT (Ultra Alta Temperatura), que eleva la temperatura de 135 a 150°C pero por un corto período de tiempo de 2 a 4 segundos y enfría inmediatamente, surgiendo con este tratamiento una leche de larga vida (Meireles, 1996).

### **1.8.2- Contaminación bacteriológica de la leche pasteurizada y vida útil**

La población bacteriana de la leche pasteurizada sin recontaminación consiste fundamentalmente de bacterias Gram positivas resistentes a las altas temperaturas. Dentro de este grupo se incluyen principalmente los gérmenes esporulados y micrococcus. (Te-Giffel et al 1997, Larsen y Jorgensen 1997, Heeschén y Hammer, 1998). La presencia de un número significativo de bacterias Gram negativas en productos pasteurizados frescos puede usualmente indicar la ocurrencia de contaminación postpasteurización y disminución de la vida útil del producto (Auclar, 1986, Dommett, 1992, Bishop, 1998, Muir, 1996<sub>2</sub>).

La vida útil de los productos lácteos es definida como el lapso de tiempo durante el cual el producto mantiene las características originales sin cambios físicos u organolépticos (White, 1993, White, 1998). La misma está determinada fundamentalmente por la contaminación de bacterias Gram negativas las cuales son capaces de crecer a temperatura de refrigeración. (Plaksanguansi, 1991). Por ello se han desarrollado varios métodos que han tenido como objetivo detectar estas contaminaciones y determinar las causas (Mosley, 1975, Waes y Bussuyt, 1981, Visser y Grote 1984, Craven et al, 1994).

Los métodos utilizados en la actualidad tanto para valorar la contaminación de la leche pasteurizada como su vida útil tienen generalmente en cuenta un período de preincubación y la utilización de un medio de cultivo selectivo para bacterias Gram negativas (Waes y Bossuyt, 1981, Phillips et al, 1983, Byrnet et al, 1989, Jenson, 1991, Muir, 1996<sub>2</sub>)

En nuestro país la NC-78-05, (1988) establece para leche pasteurizada un conteo máximo de  $5 \times 10^4$  ufc/mL en término de microorganismos mesófilos, un número máximo de 10 ufc/mL para coliformes y una vida útil de 3 días a una temperatura por debajo de 10°C.

## **1.9- Métodos rápidos para evaluar la calidad bacteriológica de la leche**

Actualmente, los métodos oficiales que se utilizan en la mayoría de los países en el control de la calidad de la leche y sus productos son las siembras microbiológicas clásicas (IDF, 1991, CEE, 1991). Con ellos se solucionan los principales problemas que se encuentran en la determinación de microorganismos (el pequeño tamaño de sus células y las interferencias con las células somáticas que les rodean) a través del empleo de una serie de herramientas: la amplificación biológica, la amplificación óptica y el marcaje óptico. Pero las ventajas que presentan estos métodos clásicos (sensibilidad, simplicidad y bajo costo) no compensan sus principales desventajas: consumir demasiado tiempo en dar las respuestas, ser un trabajo laborioso y difícil de automatizar (Van Den Vergerg, 1987, Fung, 1994).

Las desventajas antes mencionadas generó el desarrollo de los métodos rápidos en el diagnóstico microbiológico a escala internacional con el objetivo de minimizar pasos operacionales y/o los tiempos de espera para la obtención de los resultados (Adam y Hope, 1989, Fung, 1992). En principio el énfasis fue en la microbiología médica pero en las últimas décadas se ha despertado un interés cada vez más creciente en la industria alimenticia, (Vasavada, 1993, Bernadette, 1996, Tejedor, 1998).

### **1.9.1- Clasificación de los métodos rápidos de diagnóstico bacteriológico en leche**

Los métodos rápidos han sido clasificados partiendo de diferentes puntos de vistas, no obstante, en lo fundamental han tomado como base los aspectos siguientes: Rapidez con que se obtienen las respuestas (Jarvis, 1982 y Easter, 1985, Martinez y Rodrigo, 1987, Dainty y Edwards, 1991, Baumgart, 1993, Heescheen, 1996), la actividad metabólica de los microorganismos (O'Conor, 1983, Adams, 1986, Easter, 1989), posibilidades de automatización (Lahellec, 1990, Vasavada, 1993, Fung, 1994, Baumgart, 1996) y Principios de medición en que se basan las lecturas ( Bigalke, 1984, Manners, 1985, Barcina, 1889, Grappin et al, 1989, Goldschmidt, 1991, FIL, 1991, Hesscheen et al, 1991, Reybroek, 1996, Bernadette, 1996, Karwoski, 1996).

Teniendo en cuenta la diversidad de estas clasificaciones y para una mayor inclusión de métodos rápidos empleados en el diagnóstico microbiológico de la leche, están agrupados en la reseña en tres grupos: métodos directos, métodos indirectos y en métodos para diagnóstico de microorganismos patógenos (Tabla 7).

#### **1.9.1.1- Métodos Directos**

Los métodos directos se basan en la enumeración directa de las células bacterianas donde se describen el Conteo Directo al Microscopio (CDM) y la Epifluorescencia Directa (EFDT), mientras que el Dispensor de placa (Plate Loop), el Sistema de conteo en Espiral y el Petrifilm detectan colonias bacterianas.

## 1. Enumeración directa de células

**El Conteo Directo al Microscopio (CDM)** del número de bacterias en muestras de leche cruda se basa en la técnica desarrollada por Breed (1911), donde una pequeña cantidad de leche se expone uniformemente sobre un área prescrita de un portaobjeto la cual después de secada se tiñe y las células individuales o agregados de bacterias son contadas en varios campos usando un microscopio compuesto con una iluminación convencional. A partir del número de células o agregados contados y del número de campos examinados, se calcula un conteo por mililitro de la muestra de leche original.

Tabla 7. Métodos rápidos de diagnóstico bacteriológico en leche.

Grupos	Métodos	Fundamento
<b>I-DIRECTO</b>	<b>1-Conteo de células</b>	Microscopía
	Conteo directo al microscopio	
	DEFT	Formación de colonias
	<b>2-Conteo de colonias</b>	
	Dispersión en placa	
	Sistema de conteo en Espiral	
	Sistema Petrifilm	
<b>II-INDIRECTO</b>	<b>1-Actividad metabólica</b>	Enzimático
	Tensión de oxígeno	
	Catalasa	
	Reductasa	
	Citocromo E Oxidasa	Cambios físico-químicas
	Microcalorimetría	
	Flujo Citométrico	
	Impedancia	Espectrofotometría

	Turbidimetría <b>2-Compuestos celulares</b> Bioluminiscencia Limulus test <b>3-Compuestos metabólicos</b> Piruvato	Reacción biológica Reacción enzimática
<b>III-METODOS PARA MICROORGANISMOS PÁTÓGENOS</b>	<b>1-Inmunoensayos</b> Inmuno conteo magnético Aglutinación Latex Reacción enzimática en cadena con inmunoensayo fluorescente: <b>2-Otros</b> Hibridación de los Acidos Nucleicos, PCR y fagos	<b>Inmunoquímica</b>  <b>Molecular</b>

El CDM es un método rápido para estimar el grado de contaminación bacteriano de la leche pero que no está diseñado para el conteo rutinario de la leche cruda ya que el conteo en placa es más preciso y más práctico que un conteo directo ejecutado adecuadamente. El método ha sido utilizado para estimar la calidad de la leche con propósito de pago, pero su uso es limitado para pequeño número de muestras con alto conteo bacteriano ( $2.3 \times 10^6$  ufc/mL) debido a su baja sensibilidad. El método no resultó ser confiable para determinar la calidad bacteriológica de la leche de tanque cuando fue comparada con el conteo estándar en placa (CSP), lo que lo hace inadecuado como una prueba de calidad para la mayoría de las naciones productoras de leche que poseen una calidad estándar en la misma de  $1 \times 10^5$  ufc/mL o menos (Hill, 1991).

La razón fundamental para una baja precisión en comparación con otros métodos está relacionado con el hecho de que no discrimina entre microorganismos viables y muertos, así como la pequeña cantidad de muestra ensayada.

### **La técnica de Epifluorescencia Directa sobre Filtro (DEFT)**

La técnica se basa en el filtrado de la muestra a través de una membrana que retiene mohos, bacterias y levaduras y en teñir estos microorganismos con el

colorante fluorescente para su conteo mediante un microscopio de epifluorescencia. La fluorescencia es una reacción de luminiscencia en la que la energía de una luz incidente es absorbida por los átomos de moléculas o por iones de sustancias fluorescentes capaces de emitir una luz de longitud de onda superior a la que la ha excitado previamente.

Se suele emplear un colorante fluorescente que se absorba específicamente sobre las células que se pretenda reconocer. El naranja de acridina es el colorante más usado, el cual se combina con el DNA (verde) y RNA (rojo) de las células bacterianas y ello depende fundamentalmente de la edad, ciclo y fisiología del microorganismo, ya que las células en crecimiento tienen el cociente RNA/DNA elevado, y presentarán una fluorescencia roja, mientras que las células inactivas, que tienen una débil relación RNA/DNA, darán una fluorescencia verde (Dassen et al, 1987).

El uso de una serie de prefiltros, variando el tamaño de los poros y la adición de sustancias tensoactivos (como la tripsina o tritón) ha permitido que un gran número de productos pueda ser analizados con esta técnica sin pérdida de precisión. El método puede detectar  $10^3$  a  $10^4$  ufc/mL en solo 25 minutos, pero es una labor intensa y requiere gran habilidad del operador. Al aplicar esta técnica hay que tener en cuenta en las muestras tratadas por el calor que algunas células no viables pueden producir fluorescencia y traer falsos positivos (Easter, 1985).

En los últimos años se han desarrollado equipos que han automatizado la DEFT, estos poseen facilidades para el filtrado y tinción múltiple, junto a un computador analizador de imágenes, lo que hace que se pueda evaluar mayor número de muestras y eliminar el trabajo tedioso de conteo al microscopio. Dentro de estos equipos tenemos el *Bactoscan* que produce resultados en 7 minutos y puede ser apropiado para la clasificación de la leche basándose en un límite mínimo de  $5 \times 10^4$  ufc/mL. El *Autotrack* es otra versión automatizada de este método, desarrollada inicialmente para trabajar con vinos y en estos momentos se emplean en otros alimentos, también se emplea otro sistema semiautomatizado conocido como *Cobra* (Walls et al, 1991).

En el estudio con el *Bactoscan 8000* las bacterias son separadas de la muestra de leche (2.5 mL) al ser tratada la misma con un líquido lisante para disolver las proteínas y células somáticas por una técnica de gradiente de centrifugación. La suspensión separada se mezcla con una solución de enzimas para disolver cualquier partícula proteica remanente y finalmente es teñida con naranja de acridina. Las bacterias teñidas son contadas mediante el funcionamiento continuo de un microscopio epifluorescente y los resultados son monitoreados en un display. Se reportan resultados satisfactorios para la repetibilidad, estabilidad del instrumento y la relación con el conteo en placa (O'Connor et al, 1991, Fung, 1994). La DEFT puede hacerse selectiva a través de filtros específicos o con la utilización de medios especiales sobre el filtro con previa incubación, así como en combinación con reacciones serológicas (Easter, 1989, Kroll 1989 Moran et al, 1991).

## **2- Conteo de unidades formadoras de colonias**

**Método de dispersión en placa:** El método fue adaptado ampliamente para la estimación de la calidad de la leche y emplea un asa calibrada para transferir una porción definida de una muestra de leche en una placa de petri en una sola operación. El equipo ensamblado consiste en un asa de platino calibrado que se inserta al final de una aguja hipodérmica (Lver-lok) en un ángulo de 30°C. La aguja está acoplada a un dispositivo que pipetea de forma continua un diluyente estéril administrado con la pipeta. El resto de la prueba incluye la distribución del medio de cultivo sobre las placas, incubación y conteo de colonias de la misma forma que en el método convencional. Varios métodos desarrollados tienen mecanizada o automatizada la técnica del dispensador de placa, tal es el caso del *Petrifoss* y *Mini-P Petrifoss* en Dinamarca que dependiendo del instrumento pueden prepararse de 300-600 placas por hora con 1 ó 2 diluciones (Brodsky y Celben, 1980).

Otro instrumento más simple es el *Autoloop* desarrollado por Malcolm (1979). El mismo puede usarse con un asa de 0.001 ó 0.01 mL y con o sin un administrador de agar, siendo capaz de preparar 200 placas inoculadas en 1 hora. En resumen se puede decir que dicho método incrementa sustancialmente la velocidad con la cual las muestras pueden diluirse y depositarse en las placas de petri, aunque no acortan el tiempo de incubación, 72 horas a 30°C. Este método puede emplearse para conteos bacterianos de rutina con propósitos de pago y está diseñado para producir resultados que equivalen al método de referencia (Lück y Lategan (1985).

**Sistema de conteo en Espiral:** El método dispone de un dispersador que deposita de forma continua un volumen decreciente de líquido en la superficie de una placa de agar que gira a una velocidad adecuada mientras el dispersador se mueve desde el centro hasta el extremo, dando lugar a una espiral de Arquímedes. El sistema diluye y siembra de forma que se puede determinar un intervalo amplio de conteo de colonias en una sola placa. Se le señalan como limitaciones el costo y algunas dificultades para el conteo de mohos (Fung, 1994).

**Sistema Petrifilm:** Consiste en dos piezas filmicas que contactan con el nutriente del medio en su estado sólido. La muestra diluida es aplicada sobre el film y después de incubada, las colonias son contadas mediante el revelado (Dziezak, 1987). La técnica se ha empleado en la estimación de psicrófilos con resultados aproximados de 48 horas, incluyendo el período de preincubación o de amplificación del nivel inicial de microorganismos. Los valores de correlación se encuentran entre 0.75 y 0.80.

### 1.9.1.2- Métodos Indirectos

Los métodos indirectos están relacionados con la actividad metabólica o con mediciones de constituyentes específicos de la célula durante su crecimiento y los mismos se clasifican en tres grupos: **El primero** se basa en la medición de crecimiento o proceso relacionado con este, donde las mediciones son el producto de las modificaciones que sufre el sustrato asociados con la actividad metabólica de las bacterias. Este procedimiento requiere un período de incubación en el cual se producen cambios físicos o bioquímicos en el medio.

Mientras que **el segundo** grupo está relacionado con las mediciones de las concentraciones de constituyentes específicos de las células como ATP, el cual está presente en las células activas, así como la lipopolisacaridasa, **el tercer** grupo se fundamenta en la determinación de compuestos metabólicos que aparecen en la muestra como consecuencia del catabolismo de los microorganismos durante el almacenamiento del producto. Estos dos últimos grupos no requieren períodos largos de incubación (Grappin, 1989).

## **1- Métodos que detectan la actividad metabólica**

### **Tensión de oxígeno**

El O<sub>2</sub> es el primer aceptor de electrones para muchos microorganismos en el proceso de respiración y metabolismo, excepto en los anaerobios obligados, la reacción o volumen de consumo de O<sub>2</sub> es proporcional a la actividad metabólica y número de microorganismos. Partiendo de estos elementos, la utilización del O<sub>2</sub> tiene varias aplicaciones en biología, ello es usualmente válido si se utilizan manómetros o electrodos de O<sub>2</sub> haciéndose más sensitiva y rápida la prueba, aunque tiene como desventaja que puede usarse solo una vez. La técnica puede ser aplicada para detectar y conocer la actividad de la población microbiana total en muestras de leche. Un contenido de O<sub>2</sub> de 10 % o menor, expresado en términos del porcentaje de saturación, indican un conteo en placa promedio de  $7 \times 10^6$  ufc/mL (Lück et al, 1970).

Resultados satisfactorios también son reportados por Rongvaux Gaida et al, (1990) en estudios llevados a cabo con un microrespirómetro basado en la medición del consumo de O<sub>2</sub>. Durante la incubación a 30°C el consumo inicial de O<sub>2</sub> de una muestra de leche se debe esencialmente a la actividad respiratoria de las células somáticas la que disminuye y llega a ser insignificante comparada con la actividad bacteriana durante la fase de crecimiento exponencial. El coeficiente de correlación obtenido por este mismo autor en 43 muestras de leche cruda, que fluctuaron entre  $5 \times 10^4$  y  $5 \times 10^7$  ufc/mL fue de 0.96 con una desviación standard residual de 0.225 log ufc/mL; no obstante la prueba del O<sub>2</sub> no debe ser aplicada como una prueba rápida de plataforma porque solo la leche de muy mala calidad podría ser identificada.

### **Catalasa**

—

La catalasa es una enzima presente en las células de la mayoría de los animales y plantas, la cual desdobra el peróxido de hidrógeno en agua, con liberación de oxígeno. Dicha enzima es producida fundamentalmente por microorganismos de la flora psicrótrófa, donde se destacan los Géneros:

Pseudomonas, Enterobacterias, Flavobacterias, Alcalígenes y otros. El oxígeno liberado en la reacción indica la actividad catalásica, la cual es relativa a la carga microbiana. La correlación entre este método y el conteo en placa en muestras de leche cruda según Fung (1994) fue de 0.69, lo que la hace potencialmente útil para el análisis bacteriológico.

Se describen dos métodos para la determinación de catalasa, uno el de columna de gas con pipeta de Pasteur y otro conocido comercialmente como Catalasameter.

El equipo Catalasameter mide el tiempo de flotación de un disco de papel en un tubo que contiene peróxido de hidrógeno con la muestra inoculada. El tiempo de flotación está relacionado directamente con el número de microorganismos productores de catalasa.

Las limitaciones de dicha prueba están dada por la existencia de microorganismos que no producen catalasa, otros que generan altas concentraciones de la enzima (ejemplo *E. coli*), la dependencia entre la temperatura, edad y condición fisiológica de las bacterias, así como la interferencia de catalasa de origen tisular (Fung, 1994).

## **Reductasa**

Las pruebas de reducción de colorantes se han utilizado durante muchos años como indicadores de la calidad microbiológica de la leche y otros productos alimenticios. Están basados en la medición de la actividad metabólica de las bacterias, ya que muchas de ellas poseen las enzimas deshidrogenasas, las cuales transfieren hidrógeno de un sustrato a un aceptor biológico reduciéndolo. Tal es el uso de la prueba de reducción del azul de metileno, de la resazurina y del trifeniltetrazolium, no obstante, a partir de los años 60 la introducción masiva de la refrigeración trajo consigo la predominancia en la microflora de la leche de los gérmenes psicrótrofos, los cuales tienen poco poder reductor, limitando con ello la utilidad de la prueba de reducción (Easter, 1989).

En el procedimiento se utilizan patrones de azul de metileno o resazurina y se observa el proceso de reducción del colorante (de azul a blanco para el azul de metileno; de azul apizarrado a rosa o blanco para la resazurina). El tiempo necesario para que se produzca la reducción del colorante está relacionado con el número de microorganismos de la muestra. Teniendo en cuenta que los métodos de reducción no funcionan eficazmente en leches refrigeradas, se ha sugerido la sustitución de estas por otras técnicas rápidas (Easter, 1989). Un claro ejemplo de esta problemática es que la correlación entre el Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) y el  $\log_{10}$  del conteo total en leche que no ha sido refrigerada puede alcanzar valores superiores a 0.80, pero cuando la leche es refrigerada dicha correlación disminuye considerablemente ( $r=0.40$ ) y se incrementa la varianza. Cuando la prueba se aplica rutinariamente en leche refrigerada se puede tener un criterio aproximado de la calidad bacteriológica de la misma, siempre que se trate de altos conteos, pero en leche con niveles de contaminación en el orden de  $10^5$  ufc/mL o menos no

permite un criterio seguro aun con pruebas de preincubación (Sebela et al, 1991, Luck, 1991).

### **Citocromo oxidasa**

Esta enzima cataliza la reducción del oxígeno a H<sub>2</sub>O y es una importante enzima terminal en el mecanismo de la respiración de ciertas bacterias, la misma puede ser utilizada como un indicador de la actividad metabólica y del número de microorganismos. En la detección se utiliza una prueba de reducción de colorantes con N,N<sub>1</sub>, N<sub>1</sub> tetrametil- p - fenileno-diamina (TMPD), el cual ha sido extensamente utilizado en importantes pruebas taxonómicas. La prueba ha sido utilizada en la determinación y enumeración de psicrótrofos Gram negativos en leche, siendo una técnica simple, fácil y rápida, pudiendo detectar 1x10<sup>4</sup> ufc/mL o más, pero solo es sensible para determinar organismos psicrótrofos en leche pasteurizada luego de un período de preincubación (Kroll, 1989).

### **Microcalorimetría**

Se basa en la medida de los pequeños cambios en la producción de calor resultante del crecimiento microbiano, estando implicada las modificaciones de la entalpía. Esta técnica se ha utilizado con éxito para el recuento de bacterias durante la alteración de conservas enlatadas y el pan, así como en la diferenciación entre las Enterobacterias. Para la determinación de los datos microcalorimétricos se necesita el empleo de calorímetros especiales, los cuales pueden ser automatizados o computarizados, siendo los más utilizados los calorímetros adiabáticos y los fluxométricos térmicos, tal como el Calvet que es uno de los más empleados. Gaida et al, (1989) plantean que en la práctica se han reportado muy buenos resultados en leche cruda con microrespirómetros de alta sensibilidad. Su principal desventaja es que no permite trabajar un gran número de muestras y que el instrumento es muy costoso (Goldschmidt, 1991).

### **Flujo Citométrico**

Es un método automatizado para el conteo de células individuales previamente separadas y teñidas sobre una lámina, al pasar por un flujo laminar ubicado en el plano focal del detector. El procedimiento para la detección de levaduras en yogur fue desarrollado en Francia (Chemeflow), pero la técnica puede ser aplicada también en la detección de bacterias, tanto en leche como en productos lácteos. El sistema químico de flujo involucra la nutrición y metabolismo de sustratos fluorogénicos por los microorganismos en cuestión con la consiguiente formación de productos finales intracelulares, que fluorescen a la luz ultra violeta en dependencia del número e intensidad de la partícula. El tiempo consumido para la preparación inicial del equipo y las muestras esta alrededor de 30 minutos, aunque la lectura de las mismas es muy rápida siendo de aproximadamente 2 min/muestra y puede detectar hasta 100 lev/mL. Con preincubación de 24-48 horas, el método puede detectar 1 lev. en 10 y 100 grs respectivamente (Goldschmidt 1991, Reibroek, 1996).

El instrumento proporciona un histograma que registra el número de partículas fluorescentes, así como la intensidad de fluorescencia, lo cual ofrece una información adicional para la interpretación de los resultados (Haynes, 1988).

## **Impedancia**

La observación de las variaciones de impedancia debidas al metabolismo microbiano se reportó por primera vez en el año 1898. No obstante es sólo en los últimos años que este procedimiento ha ganado interés debido a la disponibilidad de instrumentos modernos. La técnica se basa en la detección de los cambios electroquímicos producidos por la actividad metabólica de los microorganismos inoculados previamente en el medio de cultivo. Generalmente sustratos no cargados son metabolizadas hasta compuestos más simples (por ejemplo proteínas hasta aminoácidos, carbohidratos hasta lactatos y lípidos a acetatos). Estas moléculas finalmente formadas son más pequeñas y por ende más móviles trayendo con ello cambios en la conductividad eléctrica que puede ser detectada insertando sensores en el medio de cultivo inoculado (Van Crumbrugge y Waes, 1991).

La técnica se ha utilizado con éxito para la determinación del conteo total de bacterias en leche, en la predicción de la vida útil (leche y quesos) y en el control de cultivos iniciadores. También se ha usado en la industria cárnica y para comprobar la pasteurización del huevo (Piton, 1990, D'ombrain et al. 1990, Silly y Forsythe 1996). La prueba puede ser específica para ciertos grupos de microorganismos utilizando medios de cultivos selectivos, así como para la identificación o separación de grupos de bacterias por sus respuestas características en cultivos puros (Scott y Robertson, 1985).

El tiempo requerido para alcanzar un cambio significativo en la impedancia se llama tiempo de detección, el cual depende de las condiciones típicas del sistema, es decir, temperatura, medio, tipo de electrodos y de las características microbianas como concentración, actividad metabólica y tiempo de generación, necesiéndose entre  $10^6$ - $10^7$  ufc/mL para producir una aceleración detectable en la curva de impedancia. Así el tiempo de detección será mayor en muestras con menor carga inicial de microorganismos. Después que dicho umbral se ha sobrepasado, los cambios en la impedancia con el tiempo pueden ser proporcional al número de células viables (Firstenberg-Eden y Eden, 1984, Nieuwenhof Hoolwerf, 1987<sub>1</sub>).

Para usar el método en esquemas de pago de calidad se requiere un tiempo mínimo de 8-10 horas, cuando las muestras poseen menor de  $1 \times 10^5$  ufc/mL, aunque no se dispone de mucha información acerca de la aplicación del método en este campo (IDF, 1991). Spolaor et al, (1989) emplearon el método en Italia (Aosta Valley) para establecer rangos de calidad de la leche cruda para la producción del queso Fontina atendiendo al tiempo de detección basado en el conteo de Coliformes como sigue:

Tiempo de detección (hrs)	Conteo ufc/mL	Característica
---------------------------	---------------	----------------

5,7	$1 \times 10^3$	Aceptable
-----	-----------------	-----------

2,9 - 5,7  $1 \times 10^3$  -  $1 \times 10^4$  Dudosa

2,9  $2.1 \times 10^5$  Inaceptable

Los análisis estadísticos de los resultados mostraron que la correlación con el método de referencia fue relativamente baja, considerando la prueba como un análisis cualitativo más que para análisis cuantitativo ya que la clasificación sólo se puede realizar dentro de amplio rango de variación de los conteos.

### **Turbidimetría**

La técnica más adecuada para medir la masa celular de los microorganismos unicelulares es el método óptico, consistente en la determinación de la cantidad de luz difractada por una suspensión de células. Esta técnica se basa en el hecho de que las partículas pequeñas difractan la luz de manera proporcional, dentro de ciertos límites, a su concentración. Cuando un haz luminoso pasa a través de una suspensión bacteriana, la reducción en la cantidad de luz transmitida como consecuencia de la difracción es una medida de la densidad celular. Tales mediciones se hacen habitualmente con un espectrofotómetro o nefelómetro (Zinsser, 1994).

Estos instrumentos miden unidades de absorbencia (A); la cual se define como el logaritmo del cociente entre la intensidad de luz incidente sobre la suspensión ( $I_0$ ) y la luz transmitida por la misma (I):  $A = \text{Log } I_0/I$

La técnica turbidimétrica es adecuada para estimar la densidad poblacional (número de células por unidad de volumen de la suspensión celular), y cuando se calibra con suspensiones bacterianas de densidad conocida constituye un método exacto y rápido de estimación de bacterias por unidad de volumen del cultivo; en general, el límite inferior de sensibilidad del método se logra cuando las suspensiones bacterianas alcanzan una concentración de unos 10 millones de bacterias o mayores. Para medir con mayor sensibilidad la luz difractada puede utilizarse un instrumento denominado nefelómetro, el cual posee un dispositivo sensor de luz situado en ángulo recto con el haz de luz incidente, por lo que ese aparato puede medir directamente la luz difractada. (Stainer et al, 1984).

### **Empleo de la Técnica en el diagnóstico microbiológico**

La medida de la turbidez no es una técnica nueva en microbiología ya que ha sido utilizada para estudiar el crecimiento bacteriano como una medida de la concentración celular. Las bacterias (y cualquier otra materia suspendida), absorben y dispersan la luz transmitida la cual es medida a una frecuencia fija registrando así los cambios turbidimétricos de un medio de cultivo líquido al relacionarlo con el control estéril. Los cambios generales por el crecimiento microbiano pueden ser cuantificados, cuando estos se relacionan con métodos de medición directos como es el caso del conteo celular y/o el peso seco (Easter, 1989).

Se han efectuado varios trabajos en los que se utiliza ésta técnica para determinar la calidad microbiológica de los alimentos, uno de los primeros estudios fue desarrollado por Nieuwenhof y Hoolwerf (1986) quienes la utilizaron en la detección de contaminación postpasteurización en leche pasteurizada, Mattila y Alivehmas (1987) emplearon la técnica para el recuento de bacterias en leche cruda. Para ello, usaron leche contaminada como inóculo añadido a un caldo nutritivo en cantidades próximas al límite de detección del instrumento, obteniéndose resultados satisfactorios en leche y otros alimentos (Mattila, 1987).

Arkesteijn, (1987) y Jakob et al, (1989) emplearon la técnica para evaluar la calidad microbiológica de varios alimentos no lácteos y Serra y Escobar, (1989) lo aplicaron en la evaluación de leche y cremas pasteurizadas señalando que el mismo puede ser una alternativa del conteo en placa. En todos estos casos ha sido empleando un turbidómetro con haz de luz vertical (Bioscreen).

El método turbidimétrico es incluido en la mayoría de las revisiones sobre métodos rápidos de diagnóstico microbiológico empleados en alimentos (Martínez y Rodrigo, 1987, Easter, 1989, White, 1993, Fung, 1994), más recientemente. Junker et al, (1994) hacen una revisión de los sistemas disponibles para monitoriar la densidad celular en línea e *in situ*, teniendo en cuenta los principios de operación y las capacidades de aplicación de los mismos. Mc Clure et al, (1993) evaluaron la relación entre la velocidad específica de crecimiento máximo ( $\mu(\max)$ ) determinada a partir del conteo de bacterias viables y las mediciones turbidimétricas para varias especies bacterianas con el propósito de valorar las posibilidades de la turbidimetría en la microbiología predictiva. Se utilizaron dos métodos turbidimétricos para la estimación de  $\mu(\max)$ . Uno es basado en las mediciones de la transmitancia y el otro en la adsorbancia. Ambos fueron comparados con las estimaciones obtenidas por el método de conteo de viables, concluyendo que las mediciones turbidimétricas pueden ser utilizada para la estimación de  $\mu(\max)$ . Resultados similares son reportados por otros autores; Manninen et al (1990), al evaluar gérmenes patógenos de alimentos, Whiting y Oriente (1997) al trabajar cepas de *Clostridium botulinum* tipo B y Tchango-Tchango et al, (1997) al evaluar la cinética de crecimiento de levaduras.

En nuestro país existe con este principio de medición el sistema *Diramic*, el cual fue desarrollado por el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC). El mismo se utiliza en las unidades de terapia intensiva y atención primaria de salud para la determinación rápida de antibiogramas y de infecciones urinarias. Basado en las modernas técnicas de los microprocesadores determina las modificaciones que origina el crecimiento bacteriano en el medio de cultivo, para caracterizar el patrón de susceptibilidad a los antibióticos en 4 horas. El sistema puede utilizar para el análisis no solo cepas aisladas y purificadas de bacterias, sino también muestras directas de hemocultivos positivos y de orina, lo que permite eliminar el tiempo que se consume en el proceso de aislamiento y purificación.

La experiencia de su aplicación en el país ha mostrado niveles de correspondencia con el método convencional empleado para el antibiograma

del 95 % y para la detección de infecciones urinarias de 97 % (Contresras et al, 1993 y 1995), mientras que internacionalmente Serufo et al, (1995), reportan que el sistema tiene una correlación con el método estándar de Conteo en Placa con Medio CLED del 98.9%, mientras que Blondeau et al, (1997) obtuvieron para este análisis una sensibilidad de 88% y una especificidad de 98%. Mediante este sistema también es posible hacer estudios de susceptibilidad a antibióticos de bacterias patógenas. La correspondencia encontrada con el método estándar de Bauer-Kirby en el trabajo realizado por Serufo et al, (1995) fue de un 94.2% mientras que Blondeau et al, (1997) señala una correspondencia del 94%. El sistema presenta ventajas con respecto a los métodos convencionales al reducir el trabajo asociado al procesamiento de las muestras, el tiempo en el que se obtienen los resultados es menor y permite ahorrar materiales; siendo por tanto un método económico a utilizar en laboratorios donde se procesa un gran número de muestras ó en laboratorios de pocos recursos.

## **2- Detección de constituyentes celulares**

### **Bioluminiscencia**

Esta se basa en una serie de reacciones enzimáticas (generalmente a cargo de oxidasas) que generan fotones de luz y tiene lugar en determinados seres vivos, como por ejemplo en la luciérnaga. Para su procedimiento se obtiene la enzima luciferasa de un coleóptero de la familia Lampyres, el *Photinus pyralis*, la cual en presencia de sus dos sustratos, luciferina y ATP microbiano, produce una reacción bioluminiscente que se puede medir con un espectrofotómetro. La luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra, se puede por lo tanto hacer una estimación del número de microorganismos presentes ya que el contenido de ATP en las células bacterianas es generalmente constante (1 fgATP/cel.) (Starker 1984, Martínez y Rodrigo, 1987). Las principales limitantes de la prueba se han resuelto en primer lugar con la homogeneización del alimento y separando los microorganismos del mismo por algún método físico como la filtración. En segundo lugar extrayendo y destruyendo de forma selectiva el ATP no microbiano (Easter, 1989, Ashley, 1991, Fernández et al, 1996).

El tiempo requerido para el análisis es muy corto (aproximadamente 1 minuto), pero partiendo de la preparación de la muestra, el tiempo tomado usualmente es de 5-15 minutos. El empleo de equipos semiautomatizados como el Lumac y automatizado como el Bactofoss permiten la detección de las bacterias en un rango entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^7$  ufc/mL (Grappin, 1989; Ericson y Olsen, 1998).

En estudios realizados con el BactoFoss para conocer la calidad de la leche cruda se comprobó que el equipo puede usarse para determinar niveles microbianos desde  $10^4$ - $10^8$  ufc/mL de leche de tanque y en la leche almacenada a temperatura de refrigeración con valores de repetibilidad de

0.048 log<sub>10</sub> (Waes et al, 1989, Rongvaux-Gaida y Piton 1991), aunque recientemente se ha encontrado en varias muestras que sobreestima el conteo de viables (Reybroeck, 1996). También el equipo se utilizó para estimar la vida útil de leches pasteurizadas y cremas después de preincubar las muestras a 21°C por 25 horas en presencia de una solución inhibidora designada para prevenir el crecimiento de las bacterias Gram positivas (Griffiths, 1992) y en evaluación de la limpieza de equipos de ordeño (Nieuwenhof, 1996).

## **Limulus TEST**

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por la producción de endotoxinas a partir de la membrana celular, la cual está compuesta por una capa lipopolisacárida (LPS) y las mismas pueden ser detectadas por la formación de un gel o mediante ensayos colorimétricos o turbidimétricos, usando el LAL (limulus amebocyte lysate) como reactivo. Este es preparado a partir de la sangre del cangrejo de herradura *Limulus polyphemus* (Moody et al, 1996).

Las LPS son termoestables y pueden ser detectados aún en productos lácteos tratados por el calor. En estudios sobre estos productos Suhren y Heeschen (1982), definieron una ecuación de regresión para estimar microorganismos y determinaron que un ng de LPS corresponde a un conteo total de  $2 \times 10^4$  ufc/mL como promedio, así como en cultivos puros el contenido de LPS de Enterobacteriaceae es 3-4 veces superior al contenido de LPS de Pseudomonadaceae. Para un mismo nivel ( $1 \times 10^5$  ufc/mL), corresponden 26.6 ng LPS/mL para Enterobacteriaceae y 6,9 ng para Pseudomonadaceae con una desviación standard (DS) que oscila entre 9 - 79 ng/mL y 2,6 -18,87 ng/mL respectivamente.

Rongvaux-Gaida et al, (1991) aplicaron una versión turbidimétrica de la prueba de limulus para evaluar la flora Gram negativa en leche cruda y reportan un límite de detección para el método de  $2.9 \times 10^4$  ufc/mL, una Sr de 0.082 (en unidades/mL de log endotoxinas) que varió con la concentración de endotoxinas en la leche.

El valor de la prueba descansa en la rapidez con que pueden obtenerse los resultados, pudiéndose seleccionar los alimentos que tengan valores elevados con esta prueba y ensayarlas después con otros métodos, mientras que los que tienen niveles bajos pueden situarse de inmediato en la categoría de alimentos pocos contaminados por bacterias Gram negativas viables. El procedimiento LPS tiene buenos valores de correlación ( $\geq 0.85$ ) cuando se realiza atendiendo a todas las condiciones descritas para el análisis ya que la calidad de los materiales (cristalería, agua, etc.), puede afectar los resultados debiéndose tomar extremo cuidado. (Suhren, 1986 y Mottar, 1987).

## **3- Métodos que detectan productos finales del metabolismo**

## **Piruvato**

El piruvato es un compuesto intermedio dentro de una gama amplia de elementos formados por la actividad metabólica y por ello es constituyente de todas las células bacterianas. Se sugiere la medición del piruvato como un indicador de la calidad higiénica de la leche inmediatamente después del ordeño. El nivel de piruvato normal en leche es de 0.5 - 1.5 mg/l, el cual no se relaciona con el conteo inicial de bacterias, pues proviene de otras fuentes como los leucocitos, además el nivel de piruvato limita la utilidad de esta prueba para bajos niveles de microorganismos ya que varía de acuerdo a las condiciones de almacenamiento del producto. Por esta razón, la medición del piruvato no es un método factible para determinar la calidad higiénica de la leche con bajos niveles microbianos, siendo solo útil para detectar leches con altos conteos bacterianos ( $1 \times 10^6$  ufc/mL). La prueba tiene como ventajas su rapidez y facilidad de automatización (Suhren, 1982, Suhren, 1991).

### **1.9.1.3- Métodos rápidos para detectar microorganismos patógenos**

Los métodos rápidos de diagnóstico de microorganismos patógenos y sus toxinas permite mejorar la protección al consumidor, máxime si se tiene en cuenta que los métodos convencionales requieren generalmente de varios días y presentan limitaciones en su sensibilidad, especificidad y selectividad. Técnicas como el inmunoensayo (Beumer y Brinkman, 1989, Beumer et al, 1990, Curiale et al, 1990, June, 1992), hibridación de Ácidos Nucleicos (Chan, et al, 1990, Curiale et al, 1990), inmunodifusión (Flower y Klark, 1989) y la conductividad eléctrica (Easter y Gibson, 1985, Silly y Forythe, 1996), son técnicas utilizadas para detectar patógenos en alimentos tales como Salmonella y Listeria entre otros. En los últimos años se han estado utilizando métodos basados en la inmunocaptura magnética (Jackson et al 1992, Gooding y Choudary, 1997), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por la amplificación material genético (Wernars, et al 1991), las pruebas con genes lux (Reybroeck, 1996) y otras de tecnologías genética.

#### **1- Inmunoensayo**

La prueba de inmunoensayo se basa en una interacción de antígenos y anticuerpos que pueden ser visualizada por aglutinación o formación de grumos, desarrollo de colores a partir de sustratos cromogénicos, formación de una inmunobanda o fluorescencia.

**El test de ELISA** para detectar Salmonella y Listeria se desarrolló sobre los años 80, y actualmente se emplea en la versión de micro ELISA acompañada de Ac monoclonales para Salmonella y Listeria. En estudios efectuados sobre muestras contaminadas artificialmente con Salmonella, para evaluar kit de ELISA con el método convencional no se encontraron diferencias significativas ni en su sensibilidad ni especificidad. (Datta et al, 1988, Curiale et al, 1990, Eley, 1990, Eley, 1990, June, 1992).

## **Aglutinación Latex**

Este es el método más simple de los inmunoensayos desarrollados recientemente. El test usa partículas de Polistireno Latex las cuales contactan con el anticuerpo. La presencia de antígenos (Ag) en la muestra se verifica después de la incubación ya que al no existir antígenos las partículas Latex formaran un sedimento (Reybroeck, 1996).

## **Inmuno conteo magnético**

Un nuevo enfoque para facilitar la inmunocaptura de antígeno en muestras de alimentos lo constituye el inmuno conteo magnético. En este método, una muestra de alimento se liga con un contador ferrometálico cubierto en plástico con los anticuerpos (Ac) específicos para el microorganismo patógeno, después de un período de incubación para que permita la unión Ag + Ac (inmunocaptura), el material no unido puede ser rápidamente eliminado mediante fuerza magnética. Dos test para detectar Listerias han sido ensayados y los mismos no requieren períodos de preenriquecimiento, el método ha sido capaz de detectar una Listeria en muestras que contienen más de  $1 \times 10^4$  ufc/mL de bacterias saprófitas. La sensibilidad se mantuvo por debajo de  $10^4$  para Listerias totales y 0.6 ufc/g para la Listeria onocitogenes (Jackson et al, 1992).

## **Reacción enzimática en cadena con inmunoensayo fluorescente**

Es una versión de la tecnología de ELISA que emplea medida fluorescente como indicador de reacción positiva. Con esta técnica se han ensayado sistemas de inmunodiagnóstico ultiparamétrico para la detección directa de antígeno de Salmonella, Listeria, o enterotoxinas en los alimentos y a diferencia del ensayo de ELISA el inmunocontraste fluorescente en cadena enzimática es completamente automatizado y no requiere ninguna manipulación manual (Vasavada, 1993).

## **2- Otros**

### **Hibridación de los Acidos Nucleicos**

La técnica de hibridación de Acidos Nucleicos (AN) puede ser empleada para detectar contaminantes patógenos de una forma rápida y exacta. El método incluye una porción de una cadena simple de AN que puedan ligarse a los ADN o RNA específicos presentes en los alimentos. Una prueba comercial para detectar *Salmonella* y *Listeria* fue introducida por Fitts (1985, Curiale et al, 1990), con este ensayo los resultados son obtenidos en un período de 48 horas a diferencia del método convencional que requiere de 5 a 7 días. El método es rápido, sensible y específico pero el empleo de isótopos radioactivos limita su uso en muchos laboratorios.

La comparación del método de hibridación de DNA colorimétrico con los procedimientos convencionales para la detección de Salmonella fue reportado Chan, et al, (1990) señalando que en un total de 1000 muestras de alimentos,

representativo de 20 tipos diferentes de productos lácteos donde se incluía leche descremada en polvo (LDP), suero de queso liofilizado y leche achocolatada entre otros, se concluyó que el método de hibridación era tan efectivo como los métodos oficiales, lo cual fue comprobado por estudios interlaboratorios y reconocido como método oficial

### **PCR- Reacción en cadena de la polimerasa**

El PCR es una técnica utilizada para amplificar un segmento de DNA que es flanqueado por dos regiones de la frecuencia conocida. En un ensayo típico de PCR, la DNA polimerasa termoestable y un 5' 3' oligonucleotido específico son sometidos a una serie de reacciones de polimerización para amplificar la molécula de DNA a  $10^2$  moléculas. El DNA amplificado es detectado mediante el uso de gel agarosa o una hibridación meridional empleando una prueba serológica.

El PCR ha sido usado para la detección de bacterias patógenas como la E. coli (Gooding y Choudary 1997), L. monocitógenas (Wernars et al, 1991), Micobacterium tuberculosis (Sjobring et al 1990) y otros. La técnica de PCR ha sido una alternativa atractiva para la detección de bajas concentraciones de microorganismos patógenos ( $10^2$  ufc/g). Esta técnica es altamente sensible, específica y no requiere de cultivos de enriquecimientos, sus principales limitaciones la constituyen la obtención del preparado de DNA para la amplificación, la producción de un preparado PCR no específico y el requerimiento de un ambiente de trabajo muy limpio. También los microorganismos que son muertos durante el procesamiento no son reconocidos como tales y si el DNA está presente lo identifica como falsos positivos. Este problema puede ser resuelto mediante un corto paso de enriquecimiento previo a la extracción del DNA, no obstante constituye una técnica potencialmente factible de ser utilizada en la microbiología láctea, (Vasavada, 1993).

### **Tecnología de Gen Lux o Métodos basados en fagos**

El principio de este método requiere la introducción (clonación) de los genes encontrados en bacterias luminiscentes en los genomas del bacteriófago. Al infectarse la bacteria hospedera (oscura) por el fago esta produce bioluminiscencia. La intensidad de la medida de luminiscencia con un luminómetro es relativa a la concentración de la bacteria en cuestión. Varias aplicaciones interesantes de esta técnica han sido desarrolladas en laboratorios microbiológicos de los alimentos, incluyendo la detección de patógenos específicos y organismos indicadores, monitoreo de actividad de cultivos y bacteriofagos, evaluación de la eficacia de antibióticos y otras sustancias con actividad antimicrobiana, así como en la predicción de la vida útil en anaquel (Griffiths, 1992, Baker et al, 1992).

## CAPITULO II

### Materiales y Métodos Generales

#### 2.1- Origen de las muestras

Las muestras de leche cruda se tomaron de vacas individuales, mezclas de vaquerías con ordeño manual y mecanizado, cisternas de carros colectores y en silos de las plantas procesadoras, de tal forma que abarcó el universo de condiciones de manejo y manipulación de la leche cruda hasta la fábrica.

Las muestras de leche pasteurizada se recolectaron de varios puntos del proceso de fabricación incluyendo leche cruda homogeneizada, salida del pasteurizador, tanques guarda, llenadoras y neveras, obteniendo una representación de los diferentes niveles del flujo de producción.

#### 2.2- Procedimiento para la toma de muestra

El procedimiento dependió del origen, volumen y recipiente de almacenamiento (NC-78-25, 1986, Norma CEE, 1991).

**Animales individuales:** Finalizado el ordeño se agitó con presión de aire el contenido de pomo colector e inmediatamente se abrió la llave inferior dejando correr un volumen aproximado de un litro antes de tomar la muestra.

**Cántaras:** Se homogeneizó previamente con un agitador de acero inoxidable, tomando de cada cántara una cantidad proporcional, hasta alcanzar el tamaño de la muestra.

**Tanques colectores:** Las muestras se tomaron directamente mediante la válvula de salida que posee el tanque, si los agitadores mecánicos trabajaban correctamente, para ello se dejó fluir previamente una cantidad de leche no menor de 1 litro. En los casos de que el agitador se encontraba roto se procedió igual a la toma de la muestra de cántara con la diferencia de que se agitó por 20 veces y se utilizaron 5 puntos diferentes para conformar la muestra.

**Camiones cisterna:** La leche fue mezclada durante 5 minutos mediante aire comprimido limpio o agitadores manuales estériles.

**Tanques guarda:** Se sometió a un tiempo de agitación no menor de 20 minutos, y mediante el toma muestra que posee el tanque se extrajo hacia el envase la cantidad de muestra necesaria, dejando fluir previamente una cantidad de leche no menor de un litro.

**Flujo continuo:** Se utilizó la cánula de muestreo colocada en la línea de recibo, para ello se tomó una muestra continua recolectada en un receptor de muestra, su contenido fue agitado para tomar el volumen necesario de la muestra, el cual fue depositado en el envase estéril para su traslado.

**Leche pasteurizada:** Las muestras tratadas destinadas al consumo de la población se tomaron en sus recipientes, el mismo día de su procesamiento.

El envase utilizado para el traslado de las muestras, fue de vidrio esterilizable con capacidad de 1000 mL, se tomó 500 mL para los ensayos. Inmediatamente después las muestras, fueron colocadas en neveras isotérmicas y mediante la adición de hielo fundente se conservaron a una temperatura entre 4 y 10 °C hasta su traslado al laboratorio, siendo analizados dentro de las 24

### **2.3- Procesamiento de las muestras y lectura**

La muestra de leche se homogeneizó y se tomó 1 mL de la misma con pipetas de cristal estériles para adicionarlo a 9 mL de solución salina peptonada (SSP), seguidamente se preparan diluciones decimales en dependencia del tipo de leche (ISO, 8261, 1989).

### **2.4. Método convencional de conteo en placa**

En todos los ensayos a las muestras de leche cruda se les realizó la determinación de microorganismos mesófilos totales por el método convencional de conteo en placas, mientras que en la leche pasteurizada se analizó además los coliformes.

Para el conteo total de microorganismos (CSP) en leche cruda fueron utilizadas las diluciones de  $10^5$  y  $10^6$  y para leche pasteurizada  $10^3$  y  $10^4$ , mientras que para coliformes se utilizó la de  $10^4$  y  $10^5$ , y  $10^2$  y  $10^3$  respectivamente (Flujo 1 y 2). Los procedimientos de trabajo se corresponden con los descritos en las normas (FIL 100B:1991, CEE 93/29, 1991, ISO 11866, 1997).

## 2.5- Procedimiento de trabajo con el sistema Diramic

En el desarrollo de la metodología de trabajo con el sistema *Diramic* para la evaluación de la calidad bacteriológica de la leche cruda y pasteurizada se tuvo en cuenta los siguientes elementos.

Estructura y contenido de la metodología	
Muestra de leche	Diversos grados de contaminación
Dilución	Propiedades ópticas de la leche y grado de contaminación
Medio de cultivo	Líquido ajustado al principio de medición. Crecimiento de los microorganismos
Inóculo	Nivel de contaminación y sensibilidad del sistema.
Incubación	Temperatura vs tiempo mínimo de lectura. Nivel de contaminación
Lectura	Procedimiento sencillo. Lectura directa. Sensibilidad aceptable
Interpretación	Relación entre los diferenciales turbidimétricos (DT) y nivel de contaminación. Clasificación por nivel, Software

Después de ensayos iniciales para ajustar la metodología de trabajo con el sistema *Diramic* las muestras de *leche cruda* fueron diluidas en solución salina peptonada (SSP) hasta la dilución 1/1000 y una vez la muestra diluida fue inoculada a razón de 1 mL en 3,5 mL del medio para conteo en placa pero en su estado líquido (Flujo 1), mientras que para la *leche pasteurizada* se transfirió 0.5 mL de la dilución 1:100 y se incorporó el Medio EC para la detección de la contaminación postpasteurización (Flujo 2). En todos los casos se trabajó en duplicado.

### 2.5.1- Lecturas turbidimétricas

Para las lecturas turbidimétricas se procedió a la calibración del sistema empleando como blanco el medio de cultivo líquido ajustando el valor turbidimétrico inicial a 4000 +/- 10 mv. Una vez calibrado el sistema los incrementos turbidimétricos se detectaron por intersección, registrándose para ello la absorbencia inicial y a partir de esta los diferenciales turbidimétricos (DT) a las diferentes horas de incubación a 30°C. Igual procedimiento se siguió con los medios estériles utilizados como controles, lográndose con ello utilizar el

mismo medio que se sugiere en la norma internacional de lechería (FIL 100B:1991), para el conteo total de microorganismos en leche y las diluciones de 1/1000 y 1/100 que permitieron junto con el volumen del medio, una transparencia adecuada para la sensibilidad del sistema.

## **2.6- Procesamiento Estadístico**

### **2.6.1-Transformación de los datos**

Las diferencias absolutas obtenidas entre los diferenciales turbidimétricos, la estimación del número de ufc/mL por la metodología de trabajo propuesta y el conteo estándar en placa (CSP) varían en función del nivel de contaminación, asumiéndose el  $\text{Log}_{10}$  para obtener una distribución normal con varianza homogénea.

### **2.6.2- Calculo de la repetibilidad y reproducibilidad**

Los pasos estadísticos seguidos para determinar la repetibilidad y/o reproducibilidad del método convencional y de las metodologías de trabajo para la estimación de la calidad bacteriológica de la leche cruda y pasteurizada estuvieron basado en los diseños utilizados en la estimación de la precisión de los métodos de medición a nivel de laboratorio y en estudios colaborativos (FIL 135B, 1991, Norma ISO 5725/1994). Para ello se procedió de la forma siguiente:

Las mediciones fueron llevadas a cabo en condiciones de repetibilidad en un corto intervalo de tiempo, por el mismo operador, sin recalibración intermedia y con idéntico material. Durante el proceso de obtención de los datos, se tuvo en cuenta los requerimientos para el laboratorio y los materiales establecidos en la ISO 5725-2:1994.

Inicialmente se calcularon los estadígrafos simples media y desviación estándar y en la interpretación estadística de los valores señalando si existían a simple vista valores de media y desviación que no debían continuar en el estudio fueron eliminados, posteriormente se tuvo en cuenta las siguientes pruebas:

*2.6.2.1- Análisis de consistencia.* Se calculó dentro del laboratorio (k) e interlaboratorio (h) la consistencia en cada uno de los niveles de contaminación en estudio, señalando los intervalos de confianza para los niveles de significación al 1 y al 5% (ISO 5725-2-1994). Esta aunque es una prueba fuerte para eliminar laboratorios por valores aberrantes en cuanto a falta de precisión (inconsistencia dentro, dada por k) y/o exactitud (inconsistencia entre, dada por h) no es una prueba definitiva para descartar laboratorios, por ello se hizo además las pruebas de Cochran y de Grubb.

2.6.2.2- *Prueba de Cochran*, fue empleada para determinar valores aberrantes por su variación interna, es decir, por presentar problemas de precisión al tener mayor desviación entre sus réplicas que la admitida.

2.6.2.3- *Prueba de Grubb*, fue empleada para determinar valores aberrantes por su variación con respecto a la media, es decir, por presentar problemas de exactitud al tener mayor desviación que la admitida con respecto a la media general.

2.6.2.4- *Estimación de las medias y varianzas generales*. En dependencia del ensayo realizado, después de haber aplicado las pruebas para eliminar valores aberrantes, se le estimaron:

La media general para cada nivel (m)

La varianza de repetibilidad ( $S^2_r$ )

La varianza de reproducibilidad ( $S^2_R$ )

### **2.6.3- Relación entre los métodos**

Para la evaluación de la relación entre los dos métodos, se tuvo en cuenta los procedimientos de modelos de correlación lineal y regresión lineal y múltiple, así como las descripciones estadísticas, pruebas de medias y de proporciones, usando el programa computarizado SAS y CCS.

### **2.6.4- Expresión de los parámetros de precisión**

Teniendo en cuenta que la expresión de los datos a partir de la transformación logarítmicamente no da una información clara de la variación de los datos originales, se tuvo en cuenta además de los que aparecen en la norma ISO 5725/94 para ensayos de repetibilidad y reproducibilidad los parámetros siguientes: DSRG (Desviación estándar relativa geométrica), la cual expresa la variación de los datos alrededor de la media geométrica y  $RD_{95}$ . (Diferencia crítica entre duplicados), donde  $DSRG = (10^{S_r} - 1) \cdot 100$  y  $RD_{95} = (10^{2.8 \cdot S_r - 1} \cdot 100)$  (Piton y Grappin, 1991).

## CAPITULO III

### Utilización del sistema *Diramic* para la estimación del conteo total de bacterias en leche cruda

#### Introducción

El recuento de bacterias totales es el método más comúnmente usado para determinar la calidad de la leche, generalmente un recuento alto indica un estado sanitario poco satisfactorio en la unidad, condiciones de tiempo y temperatura no idóneos durante la producción y almacenamiento o combinación de ambos, sin embargo en nuestro país y en algunos otros de la región se emplean el método de reducción del azul de metileno (TRAM) para el análisis bacteriológico de la leche cruda y es conocido que esta prueba no refleja realmente la calidad bacteriológica de las muestras sobre todo las refrigeradas, por otra parte, el conteo en placa que pudiera ser el método llamado a sustituir el TRAM conlleva una gran inversión y se mantiene la limitante de su laboriosidad y el consumir demasiado tiempo en dar las respuestas (72 horas), razón por la cual existe un creciente interés en que estos métodos sean sustituidos por técnicas rápidas y automatizadas (Manner , 1985, Grappin et al, 1989, Hesschen et al, 1991, Vasavada, 1992), lo que de hecho ya constituye una realidad en los países y/o empresas con lecherías modernas.

El desarrollo de métodos rápidos y automatizados en el diagnóstico microbiológico de alimentos se ha convertido en una necesidad bajo las nuevas concepciones de calidad que predominan en la industria alimenticia, (Jarvis, 1982, Patel, 1993, Tibor, 1993 Fung, 1994, White, 1998). Dentro de estos métodos rápidos utilizados en el control bacteriológico de la leche se incluye la turbidimetría o nefelometría la cual mide la absorción o transmisión de luz en un medio líquido con partículas en suspensión y la misma puede ser cuantificable cuando es calibrada contra parámetros cuantificables conocidos, tales como el conteo total o peso seco, análisis que conlleva estudios en condiciones controladas y extensivas. (Martínez y Rodríguez, 1987, Goldschmiat, 1990, Ongvaux-Gaida y Piton, 1991).

Con este principio de medición existe en el país el sistema *Diramic* el cual se utiliza en unidades de terapia intensiva y de atención primaria para la determinación rápida del antibiograma y de infecciones urinarias (Contreras et al, 1993).

Partiendo de estas consideraciones nos propusimos en este capítulo los siguientes objetivos:

- Desarrollar una metodología analítica que posibilite el uso del sistema *Diramic* en la determinación de la carga total de bacterias en leche cruda

al compararlo con el método de referencia bajo condiciones controlada de laboratorio.

- Establecer mediante estudio colaborativo los parámetros de precisión y exactitud de la metodología desarrollada con el sistema *Diramic* y definir su alcance con relación a los métodos rápidos conocidos.
- Evaluar la metodología establecida para determinar el nivel de contaminación de la leche cruda acopiada por plantas procesadoras ubicadas en cuencas de importancia lechera en el país y definir su alcance en nuestras condiciones.

## **Experimento No 1**

### **3.1- Desarrollo de la metodología analítica y establecimiento de los indicadores de calidad para el conteo total de bacterias en leche cruda**

#### **3.1.1- Materiales y métodos**

##### **1- Muestras de leche cruda**

Las muestras de leche cruda para los diferentes ensayos fueron obtenidas de mezclas y de animales individuales en recipientes estériles las cuales se mantuvieron a una temperatura de 4-6°C hasta la realización del análisis bacteriológico, siguiendo para ello los procedimientos descritos en los materiales y métodos generales. Las lecturas con el sistema *Diramic* en todos los casos se hicieron a tiempo cero ( $T_0$ ) y posteriormente a las 6, 8, y 10 horas.

##### **2- Ensayos realizados con la metodología propuesta**

##### **Relación entre los diferenciales turbidimétricos (DT) y el conteo total de bacterias aeróbicas mesófila (CSP).**

Para el ensayo se tomó leche entera la cual fue esterilizada por tindalización y posteriormente distribuida en tubos de ensayos estériles a razón de 9 y 4,9 mL, a los mismos se les inoculó 1 mL (1/10) y 0,1 mL (1/50) respectivamente de leche cruda de mezclas con diferentes niveles de contaminación inicial ( $n=3$ ). Partiendo de estas diluciones se continuó con diluciones decimales hasta 1/100000 quedando constituidas 10 muestras que fueron sembradas de forma independiente según el procedimiento descrito, en los materiales y métodos generales para la determinación de bacterias mesófilos totales (CSP) y las mediciones con el sistema *Diramic*.

##### **Repetibilidad**

Las pruebas de repetibilidad de la metodología de trabajo se llevaron a cabo según el procedimiento de siembra descrito en materiales y métodos generales, utilizando para ello muestras con diferentes niveles de contaminación (4), analizándose individualmente 20 alícuotas en duplicado, determinándose así los parámetros de calidad.

### Curva de calibración con muestras de leche cruda

94 muestras de leche cruda de tanque colector y de animales individuales fueron evaluadas turbidimétricamente por el sistema *Diramic* utilizando la metodología propuesta y relacionadas con el conteo total de bacterias mesófilas viables.

#### 3.1.2- Resultados y discusión:

En los resultados del primer ensayo, la metodología de trabajo con el sistema *Diramic* mostró que la correlación lineal entre los DT y el CSP varía con el nivel de contaminación y el tiempo de incubación (Tabla 1), observándose en el seguimiento de las intercepciones como a medida que el nivel de contaminación disminuye el coeficiente de correlación se hace más bajo, así tenemos que a las 6 horas de lectura, el valor del nivel de  $10^5$  ufc/mL es 0.64, mientras que el de  $10^8$  ufc/mL es de 0.996, Sin embargo, esta es mejorada a las 8 horas, donde se dan los mejores resultados de forma general (Valores medios de 0.88, 0.92 y 0.73 para las 6, 8 y 10 horas de incubación respectivamente), permitiendo darle continuidad a los ensayos siguientes.

Tabla 1: Correlación lineal entre los diferenciales turbidimétricos y el conteo total de bacterias aeróbicas mesófila.

Nivel de contaminación.	Tiempo de incubación (horas)		
	6	8	10
ufc/mL			
+ $1 \times 10^8$	0.996 s	0.829 s	0.550 s
$2.8 \times 10^7$	0.997 s	0.975 s	0.710 s
$2.3 \times 10^5$	0.649 s	0.966 s	0.928 s
Media	0.880 s	0.920 s	0.730 s
Leyenda: s= significación estadística ( $p < 0.05$ ).			

La Tabla 2 muestra los parámetros de precisión de los diferentes niveles de contaminación de las leches con lecturas a las 6, 8 y 10 horas. El elemento

más característico de dichos resultados es la relación del CVr con el nivel de contaminación y tiempo de lectura, observándose en la intercepción a las 6 horas variaciones desde 71 % para el nivel de  $10^4$  ufc/mL a 7.4 % en el nivel de  $10^8$  ufc/mL y a las 10 horas de incubación los CVr de los diferenciales turbidimétricos oscilan entre 47 % y 2.7 % en estos mismos niveles. La diferencia crítica entre duplicado tuvo semejante comportamiento en este análisis (Figura 1).

Tabla 2: Medias turbidimétricas y valores de precisión, según el nivel de contaminación de la muestra y tiempo de incubación.

Tiempo de incubación	6 horas			8 horas			10 horas		
	Media	Sr	CVr	Media	Sr	CVr	Media	Sr	CVr
$\leq 10^3$ - $10^4$	11	12	71	66	46	69	194	90.4	47
$1 \times 10^5$	26.8	15.1	65	263	74.7	28.6	1008	123	11.6
$2.7 \times 10^6$	227	78	34.4	1835	55	3	2843	123	2.0
$2 \times 10^8$	1646	125	7.6	2569	71	2.8	2673	59	2.7
General		58	45.0		62	25.9		86.4	15.8

Leyenda: CVr= coeficiente de variación de la repetibilidad,

Sr= desviación estándar de la repetibilidad

Cuando los datos fueron transformados logarítmicamente (tabla 3), se observan los mismos efectos del nivel de contaminación y el tiempo de incubación sobre los parámetros de precisión, resaltando en este caso la Sr, que tiene valores de 0.14 y 0.03 para los niveles de  $10^6$  y  $10^8$  ufc/mL respectivamente a las 6 horas de intercepción, valor que se logra obtener con el nivel de  $10^5$  ufc/mL a las 10 horas (0.06), mientras que el nivel de  $10^4$  ufc/mL mantiene a este tiempo de lectura 0.41.

Los resultados de los ensayos ponen de manifiesto la potencialidad que tiene el sistema *Diramic* para estimar el nivel de contaminación bacteriana en leche cruda, partiendo de la metodología de trabajo propuesta. Se observa que la correlación lineal con el método de referencia es más significativa en los niveles elevados, obteniéndose el mejor valor medio a las 8 horas de incubada la muestra (0.92), valor considerado como excelente White, (1993). Estos

coeficientes de correlación se corresponden además con los reportados en revisiones de métodos rápidos (Grappin et al, 1989, Reichmuth et al, 1996).

Estos resultados denotan que el sistema es capaz de detectar diferentes niveles de concentración bacteriana en leche cruda variando los tiempos de intercepción. Los parámetros de precisión del método presentan valores aceptables a partir del nivel de  $10^5$  ufc/mL, conociendo la variabilidad de los métodos microbiológicos pueden ajustarse con estos resultados criterios que nos permitan definir la calidad bacteriológica de la leche cruda. En atributos dado por Grappin et al, (1989), sobre métodos rápidos indirectos incluye que la Sr puede oscilar entre 0.05 - 0.1. Como se observa en la tabla 3 todos los niveles evaluados se incluyen en este rango a partir de las 8 horas de incubación con excepción del nivel de  $10^4$  ufc/mL, aunque tampoco es anormal si consideramos que este mismo autor define como límite de determinación el nivel de  $10^5$  ufc/mL y la mayor parte de los métodos microbiológicos presentan una amplia variación en los niveles de contaminación inferior a  $1 \times 10^5$  ufc/mL. El método de ATP reporta valores de la Sr entre 0.051 y 0.091 (Ronguaux- Gaida y Piton 1991), mientras que en el de Limulus test es de 0.08 a 0.04 (Suhren et al, 1986) e impedancia 0.05 a 0.1 (Sally y Forsyths, 1996).

Tabla 3: Parámetros de precisión del método turbidimétrico, según el nivel de contaminación de la muestra y tiempo de incubación. (datos con transformación  $\log_{10}$ ).

Tiempo de incubación	6 Horas	8 Horas	10 Horas
<b>Niveles</b>	m Sr CVr DSR DSRG	m Sr CVr DSR DSRG	m Sr CVr DSR DSRG
$\leq 10^3 - 10^4$	.68 .46 40.5 2.9 188	1.46 .60 44 4.04 298	1.94 .41 23 2.75 446
$1 \times 10^5$	.89 .68 69.1 3.0 239	2.40 .12 5.03 1.34 33	3.01 .06 2.09 1.16 15.8
$2.7 \times 10^6$	2.4 .14 5.9 1.38 38	3.27 .01 .004 1.02 2.3	3.45 .01 .29 1.02 2.3
$2 \times 10^8$	3.21 .03 0.93 1.1 7	3.41 .02 .43 1.04 3.5	3.43 .01 .32 1.03 2.6
General	.33 29.1 2.10 118	.18 12.2 1.86 84	.12 6.4 1.49 44

Leyenda: m =media

Sr =desviación estándar de la repetibilidad

CVr = coeficiente de variación de la repetibilidad

DSR = desviación estándar relativa

DSRG = desviación estándar relativa geométrica.

Mattila (1987), reportó CVr de 7 % al evaluar un equipo que utiliza el principio turbidimétrico, mientras que este mismo sistema con su señal conductimétrica mostró valores de 11.5 % (Hernández et al, 1993). La influencia de la flora sobre la repetibilidad de los equipos automatizados en nuestro país puede ser mayor que aquellos de temperatura frías (Piton et al, 1990, Suhren, 1989), aun cuando se sigan los procedimientos de toma y conservación de las muestras sugeridos en las normas internacionales.

El número de muestra utilizado para la curva de calibración del sistema *Diramic* estuvo entre 80 y 100 muestras con conteos distribuidos sobre varios ciclos de  $\log_{10}$ , correspondiéndose con el sugerido para conocer la relación existente entre los diferenciales turbidimétricos y los parámetros del método de comparación, que en nuestro caso fue el conteo en placa (Busta et al 1992).

El resultado corroboró como se incrementan los DT en función del nivel de contaminación y los tiempos de incubación (Figura 2), ( $N-1=10^3$ ,  $N-2=10^4$ ,  $N-3=10^5$ ,  $N-4=10^6$  y  $N-5=10^7$  ufc/mL). Cuando estos datos fueron transformados logarítmicamente, el CVr varió desde 48.6 % en el nivel de  $1 \times 10^3$  ufc/mL hasta 0.05% en el nivel de  $1 \times 10^7$  ufc/mL a las 10 horas de incubación, y la DSRGr mostró los valores más elevados a las 6 horas en el nivel de  $1 \times 10^5$  ufc/mL, donde se observa el mayor solapamiento entre los recorridos de los diferentes niveles. Los coeficientes de variación a partir de las 8 horas (Figura 3), con excepción del nivel de  $1 \times 10^3$  ufc/mL se corresponden con los que reporta la norma FIL para el recuento de bacterias totales en leche (FIL 100B:1991).

Partiendo de las variaciones que se obtienen en la determinación del número de microorganismos en el sentido de su concordancia dentro de un intervalo determinado (Busta et al, 1992), se definieron cuatro categorías de carga microbiana en leche cruda para lecturas a los tiempos pre establecidos (Tabla 4).

Tabla 4. Relación de los Diferenciales turbidimétricos para la clasificación de la leche cruda según nivel de contaminación bacteriana.

Diferencial según tiempo de incubación (horas)			
Nivel de contaminación	6 horas	8 horas	10 horas
Extra $\leq 10^3$	0	0-----64	0-----351
A $10^4$ - $10^5$	< 89.0	70----474	666----1222

B $10^6$	100----253.0	586---1030	586----2178
C $\geq 10^7$	>253	>1030	>2178

El análisis de correlación lineal efectuado entre DT y el CSP en muestras con conteos entre  $10^3$  y  $10^8$  ufc/mL mostró mejor coeficiente en datos transformados logarítmicamente la cual se mantuvo entre 0.66-0.79 (Tabla 5), correlaciones todas significativas.

Tabla 5. Correlación lineal entre los diferenciales turbidimétricos (DT) y el conteo estándar en placa (CSP) en leche cruda. n=94.

DT no transformados	CSP (con transformación $\log_{10}$ )
DT-6	.66
DT-8	.78
DT-10	.79
DT (con transformación $\log_{10}$ )	CSP (transf. $\log_{10}$ )
DT-6	.75
DT-8	.78
DT-10	.74

Coefficientes de correlación similares y más bajos fueron obtenidos por Mattila, (1987), al analizar diferentes alimentos (0.71, 0.90 y 0.71) con esta mismo principio de medición, mientras que se reportan en leche pasteurizada y natas valores de 0.75 (Serra y Escobar, 1989). Los coeficientes de correlación en los

métodos indirectos se ven influenciados por varios factores; (White, 1993), para el método de la catalasa la correlación con el conteo en placa en muestras de leche fue de 0.69 indicándose no obstante, el considerable potencial que posee este método (Fung, 1994), mientras que Suhren y Heeschen (1982), encontraron un nivel de 0.84 para el método de Limulus test y Piton y Dassen, (1988), cuando hacen mención a la relación de las primeras versiones del método conductimétrico con el conteo en placa reflejan también niveles por debajo de 0.60.

En el análisis de regresión lineal en los datos transformados y no transformados logarítmicamente hubo variaciones en los tiempos de intercepción de la metodología propuesta con coeficientes desde 0.72 hasta 0.77 y en la regresión múltiple desde 0.80 a 0.94, existiendo alta significación en los mismos ( $p < 0.001$ ). Los valores obtenidos a las 10 horas de incubación son inferiores a los de 8 horas y en ello influyó el nivel de contaminación de las muestras que al transcurrir este tiempo de incubación producen una saturación en la turbidez que homogeneiza diferentes niveles iniciales de microorganismos.

Con los diferenciales turbidimétricos se pudo predecir a través de los modelos de regresión mostrados, las concentraciones de ufc/mL en leche cruda, indicando que la metodología propuesta para la utilización del sistema *Diramic* es eficaz, no obstante, es importante considerar las características de las poblaciones bacterianas y los conceptos de calidad que se impongan.

Tabla 6. Análisis de regresión lineal entre los diferenciales turbidimétricos (DT) y el conteo en placa de la flora aeróbica mesófila (CSP).

Diferencial	Fórmula	Coefficiente de regresión	R <sup>2</sup>
DT-6	$Y=4.3871+.72565*\log$ DT-6	.72	.52
DT-8	$Y=3.9260+.75329*\log$ DT- 8	.75	.75
DT-10	$Y=3.6660*.73038*\log$ DT- 10	.67	.52

Nota Todos los datos son transformados  $\log_{10}$

Partiendo de que los mejores resultados fueron obtenidos a las 8 horas se procedió a automatizar la información de los resultados de la calidad bacteriológica de la leche cruda y para ello se elaboró un software para el equipo, el cual permite obtener automáticamente la clasificación de bacteriológica y la estimación de la cantidad de bacterias por mL..



Se demostró en el experimento que la metodología de trabajo con el sistema *Diramic* guarda relación con la concentración bacteriana en muestras de leche cruda bajo condiciones controladas de laboratorio. No obstante, es necesario que se valore en las propias condiciones de uso práctico, la precisión del método mediante un estudio colaborativo, teniendo en cuenta que en las mismas se presentan factores que no pueden ser controlados e imitados en el ámbito de un solo laboratorio.

## **Experimento 2**

### **3.2. Validación del sistema Diramic en la estimación del conteo total de bacterias mesófila en leche cruda mediante estudio colaborativo**

#### **3.2.1- Materiales y métodos**

##### **3.2.1.1 ENSAYO COLABORATIVO CON 5 LABORATORIOS**

Estos ensayos tienen como peculiaridad que es la primera vez que se realizan en el país estudios de esta naturaleza en el análisis bacteriológico de la leche, proponiéndonos en este inicial conocer la homogeneidad de las muestras, ensayar las vías para su recolección y obtener experiencia en el procesamiento. Definiendo las interrogantes siguientes en la preparación de la muestra:

Tipo

Niveles de contaminación

Distribución

Homogeneidad a la hora de dispensar

Estabilidad

### **Selección de las muestras y preparación**

Para el ensayo se seleccionó una muestra de leche cruda a su llegada a la planta procesadora en carro cisterna, a partir de ella en el laboratorio fueron preparado 4 niveles de contaminación bacteriana, el procedimiento elegido fue el de las diluciones seriadas, empleando como diluyente estéril leche descremada en polvo reconstituida (LDPR). Se partió de la muestra (nivel 1) y de esta se tomaron 10 mL para uno de los erlenmeyer que contenía 90 mL de LDPR (nivel 2), siguiendo las diluciones hasta completar los 4 niveles.

Los niveles preparados fueron ubicados dentro de un recipiente con hielo para ser dispensada con pipeta automática calibrada y trabajadas bajo condiciones de flujo laminar. Para dispensar las muestras se emplearon bulbos de 10 mL de capacidad y el volumen dispensado fue de 2 mL por cada uno. La muestra fue agitada durante 2 minutos cada 20 bulbos dispensados, hasta completar el lote.

Una vez dispensadas, las muestras fueron semitapadas y congeladas con nitrógeno líquido para su liofilización. El proceso de liofilización duró 24 horas. Terminada la liofilización las muestras se retaparon con tapas de metal e inmediatamente se guardaron en la nevera (5 °C), hasta su distribución para el estudio.

### **3.2.1.2 ENSAYO COLABORATIVO CON 8 LABORATORIOS**

#### **Selección de la muestra y preparación.**

Se tomaron 4 muestras de leche contaminadas naturalmente que representaban puntos diferentes del proceso de obtención y acopio de leche, las cuales fueron definidas como lotes hasta llegar a conocer su nivel de contaminación:

Lote 1 y 2. Directamente del tanque de frío de vaquerías típicas de ordeño mecanizado.

Lote 3. Muestra de cantara a la llegada a la planta

Lote 4 Muestra de carro isotérmico en el momento de la descarga en planta

Las muestras fueron tomadas en días diferentes y remitidos al laboratorio de microbiología de la leche del CENLAC/CENSA, siguiendo para ello los mismos procedimientos descritos en los materiales y métodos generales.

El procedimiento de trabajo para dispensar y liofilizar las muestras fue el mismo que se siguió en el estudio anterior con la diferencia de que cada nivel en este caso fue preparado por separado.

## **Ensayos previos a la distribución de las muestras de los estudios colaborativos**

### **Homogeneidad del inóculo liofilizado**

Para el ensayo de homogeneidad fueron seleccionados de cada uno de los niveles 10 bulbos. A cada uno se les efectuó por duplicado el conteo en placa y las lecturas con el sistema *Diramic* para ello se siguió el mismo procedimiento descrito en materiales y métodos generales, en este último método se tomaron 2 tubos de lectura que se monitorearon de forma independiente. Al final se obtuvo dos resultados del equipo (duplicado) correspondiendo al valor del bulbo. El procedimiento seguido para el procesamiento de los datos fue el recomendado por la norma ISO 2602-1989 (E).

### **Repetibilidad del inóculo**

Para la realización de la prueba de repetibilidad se preparó una mezcla de leche por cada nivel a partir de la reconstitución de 10 bulbos de las muestras liofilizadas, analizándose 32 alícuotas por el sistema *Diramic* (SCD) y 20 por el conteo estándar en placa (CSP). El procedimiento seguido para el procesamiento de los datos se corresponde con el de los materiales y métodos generales.

### **Laboratorios participantes**

Unión Láctea (Camagüey, Sancti Spiritus y Fábrica Siboney), Ministerio de la Agricultura (Las empresas: Los Naranjos y Camilo Cienfuegos), Organismos Reguladores (Laboratorio Nacional de Bromatología y Laboratorio Nacional de Nutrición e Higiene) y el CENLAC como laboratorio coordinador, cada laboratorio fue codificado para mantener el carácter confidencial en la distribución y circulación de la información.

### **Distribución de las muestras**

Todos los laboratorios estaban familiarizados en el trabajo con la metodología empleada para el sistema *Diramic* pero solo 6 de ellos en el segundo estudio tenían condiciones para montar el método de referencia (1 al 5 y el 8).

Cada laboratorio recibió el protocolo de análisis, los modelos de entrega de la información y 8 muestras de leche cruda liofilizada representando 4 niveles de

contaminación con dos muestras cada uno. Los laboratorios desconocían cuales eran las muestras pareadas por niveles. Los niveles variaron de  $10^5$  -  $10^7$  ufc/mL para el conteo total y de  $10^1$  -  $10^5$  ufc/mL para coliformes.

## **Análisis**

Las muestras preparadas fueron recibidas por los laboratorios colaborativos y analizadas el día siguiente. Para el análisis las muestras se reconstituyeron con 2 mL de leche descremada estéril, atemperada a 45°C. A partir de este paso se continuó con los procedimientos de trabajo explicados para el método de conteo placa (Conteo total y de coliformes) y para las lecturas turbidimétricas (SCD) en materiales y métodos generales.

Después de la incubación, los conteos de las diferentes placas (coliformes, 24 horas y conteo total 72 horas), fueron transferidos a los modelos correspondientes y en unión de los reportes del sistema Diramic (8 horas).se remitieron al laboratorio coordinador.

## **Cálculo de la repetibilidad y reproducibilidad**

Los pasos estadísticos para determinar la repetibilidad y reproducibilidad del estudio colaborativo se corresponde con el de los materiales y métodos generales.

## **Regresión lineal**

Para valorar la influencia del nivel de contaminación de ambos métodos sobre la desviación estándar de la repetibilidad y reproducibilidad se relacionó la  $S_r$  y la  $S_R$  con sus medias mediante un análisis de regresión lineal.

### **3.2.2- Resultados y discusión**

Los resultados del primer ensayo colaborativo efectuado bajo condiciones controladas con la participación de 5 laboratorios, a los cuales se le circuló muestras preparadas en el laboratorio con diferentes niveles de contaminación mostraron que no existían laboratorios con valores aberrantes y todos estaban dentro de la media general con adecuada varianza, los parámetros de precisión de los diferentes niveles de contaminación de las muestras expresados en diferenciales de turbidez muestran una  $S_r$  que se corresponde con la encontrada en la evaluación de la metodología en el laboratorio.

Tabla 1. Resultados de los parámetros de precisión del estudio colaborativo para la estimación del conteo total de bacterias en leche cruda en DT.

Nivel	P	media	$S_r$	r	$S_R$	R
1	5	2555	151.60	427	262.60	736

2	5	1217	222.10	622	384.70	1078
3	5	308	47.73	132	82.67	232
4	5	124	34.21	95	59.25	165

Leyenda: p= número de laboratorios

Sr = desviación standard de la repetibilidad

r = repetibilidad

R = reproducibilidad

Para hacer comparable los resultados con el método de conteo en placa se valoraron los datos de estimación del conteo por el sistema *Diramic* (Tabla 2), observándose que este último tiene mejor comportamiento en la repetibilidad (Sr) y reproducibilidad (SR) que el método de referencia.

Tabla 2. Comportamiento de los parámetros de precisión por nivel. (ufc/ml  $\log_{10}$ )

Niveles	Método	Media	Sr	DSRGr	SR	DSRGR
1	CSP	7.50	0.561	270	0.581	281
	SCD	7.84	0.124	33	0.133	35
2	CSP	6.91	0.711	410	0.726	432
	SCD	7.10	0.237	72	0.228	92
3	CSP	6.38	1.670	3980	1.94	7800
	SCD	5.67	0.393	145	0.403	152
4	CSP	4.92	2.120	12580	2.58	39800
	SCD	4.51	1.220	1480	1.45	2411

Leyenda: SCD=Estimación del conteo por el Diramic

Sr=Desviación standard de la repetibilidad

DSRGr=Desviación standard relativa geométrica de la repetibilidad (r) y la reproducibilidad (R).

En el análisis del conteo de ufc/mL no existieron diferencias significativas entre el obtenido por el método de referencia y el estimado por el sistema *Diramic* en ninguno de los niveles (Tabla 3), comprobándose además que los gérmenes coliformes predominaban dentro del conteo de la flora total (Tabla 4), repercutiendo favorablemente en los resultados de estimación del conteo por la metodología de sistema *Diramic* (SCD).

Tabla 3. Comparación de los valores medios por niveles del Log<sub>10</sub> ufc/mL por el método de referencia (CSP) y la estimación del conteo por el *Diramic* (SCD).

Método	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
CSP	7.50a	6.91 <sup>a</sup>	6.38a	4.92a
SCD	7.84a	7.10 <sup>a</sup>	5.67a	4.51a

Leyenda: CSP = conteo estándar en placa

SCD = estimación del conteo por el *Diramic*

Letras difieren para  $p \leq 0.05$ .

Tabla 4. Proporción de coliformes dentro del conteo total de microorganismos por cada uno de los niveles (%).

Método	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
CSP	88.80	85.20	65.98	73.80
SCD	76.78	82.00	79.40	84.40

Leyenda: CSP = conteo estándar en placa

SCD = estimación del conteo por el Diramic.

Con este estudio se logró definir el procedimiento de trabajo para la preparación de muestras de leche cruda para estudios bacteriológico colaborativos y la exactitud del método al compararlo con el método de referencia, pasando a validar la metodología de trabajo en un segundo estudio con 8 laboratorios.

En el estudio colaborativo con 8 laboratorios los resultados de homogeneidad y repetibilidad efectuado a cada uno de los lotes antes de la circulación de las muestras permitió definir 4 niveles de contaminación bacteriana, correspondiendo los niveles 1 y 2 a las muestras tomadas al momento del acopio de la leche en planta, mientras que el 3 y 4 corresponden a las vaquerías. Bajo las condiciones del laboratorio coordinador, el análisis de varianza para definir diferencias entre muestras y dentro del mismo frasco por cada nivel resultaron ser homogéneas el 2, 3 y 4 para el CSP y la SCD, cumpliéndose así dos requisitos que se plantean para llevar a efecto estudios colaborativos que exista homogeneidad y diferentes niveles de contaminación de la muestra. Por otro lado se corroboró que la contaminación natural es factible para tales estudios microbiológicos (Berg, 1994, Richardson, 1995, In-T-Veld et al, 1996, Curieles et al 1997). Los valores de la desviación estándar de la repetibilidad (Tabla 5) de la metodología de trabajo con el sistema *Diramic* se ajustan a los encontrados en el estudio de validación del método turbidimétrico en el ámbito del laboratorio (Hernández et al, 1995), mientras Piton, (1988), encontró en estudio de leche cruda con otro método indirecto valores de  $S_r$  expresada en ufc/mL desde 0.045 a 0.410, variando en función del nivel de contaminación, correspondiéndose los valores más altos con los niveles más bajos, mientras que Rongvaux-Gaida y Piton (1991) evaluando métodos bioluminiscentes: (Prueba del ATP), obtuvo desviación standard relativa geométrica de repetibilidad (DSRGr) desde 14 % hasta 51 %, en términos de ufc/mL.

Tabla 5. Resultados de los parámetros de calidad por nivel, en condiciones de repetibilidad.

Niveles	Método	Media	$S_r$	DSRGr	r	RD <sub>95</sub>
1	SCD	$1.38 \times 10^7$	0.082	20.2	.224	67.49
2	SCD	$8.91 \times 10^6$	0.059	14.8	.168	47.2
3	SCD	$2.45 \times 10^5$	0.412	158	1.15	1158
4	SCD	$2.81 \times 10^3$	0.466	192	1.30	1895

Leyenda: SCD=Estimación del conteo por el Diramic

Sr=Desviación estándar de la repetibilidad

DSRG=Desviación estándar relativa geométrica

RD<sub>95</sub>=Diferencia crítica entre duplicado

r=Repetibilidad

Los cálculos de la dispersión de los datos (Tabla 6), teniendo en cuenta los parámetros de precisión de ambos métodos mostró mayor cruzamiento de los niveles en el método de referencia que en el sistema *Diramic*. Si bien en los niveles más bajos (léase 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup>) los rangos de variación son mayores no tienen una gran connotación práctica para leche cruda producida bajo nuestras condiciones que se caracteriza por tener un alto nivel de contaminación, elemento de importancia a la hora de definir niveles de contaminación.

Tabla 6. Prueba de Repetibilidad. Desviación a partir de los datos originales.

	Estimación del conteo por el sistema Diramic	
Niveles	Valor medio (ufc/mL)	Rango de variación
1	1.38x10 <sup>7</sup>	1.66x10 <sup>7</sup> - 1.14x10 <sup>7</sup>
2	8.91x10 <sup>6</sup>	1.01x10 <sup>7</sup> - 7.81x10 <sup>6</sup>
3	2.45x10 <sup>5</sup>	6.32x10 <sup>5</sup> - 9.49x10 <sup>4</sup>
4	2.81x10 <sup>3</sup>	8.20x10 <sup>3</sup> - .62x10 <sup>2</sup>

La tabla 7 muestra el número de unidades formadoras de colonias (ufc/mL) obtenido por la estimación del sistema *Diramic*, en cada uno de los laboratorios participantes en el estudio. Los resultados del laboratorio 3 no se muestran por no seguir el protocolo establecido. Los análisis de consistencia no reflejan ningún laboratorio fuera de rango (Figura 1), en los valores de exactitud (h), siendo los laboratorios más próximos al límite crítico (1.98) el número 5, 4 y 8 para los niveles 1, 2 y 4 respectivamente, mientras que en la precisión (k) se destaca el laboratorio 4 en el nivel 2. Con las siguientes pruebas para detectar valores aberrantes (prueba de Cochran y Grubbs) no se eliminó ningún laboratorio quedando finalmente 7 para el análisis de validación.

Tabla 7. Estimación del conteo de bacterias ( $\log_{10}$  ufc/mL) por el sistema *Diramic* en los diferentes laboratorios colaborativos.

Laboratorios	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
1	7.57	7.16	4.87	4.01
2	7.71	7.34	5.47	3.32
4	7.59	7.61	6.24	3.56
5	6.98	5.96	4.78	3.49
6	6.96	6.51	5.31	3.01
7	7.71	7.79	6.54	4.40
8	6.86	7.10	5.14	2.87

Los resultados obtenidos del estudio de la varianza de la repetibilidad y reproducibilidad (Tabla 8) partiendo de los datos transformados  $\log_{10}$ , mostró diferencias de mayor significación entre los laboratorios ya que en el análisis de las réplicas solamente el nivel uno no muestra homogeneidad en ninguno de los métodos empleados, comportamiento que se corresponde con el encontrado en el estudio previo a la distribución de las muestras, mientras que entre duplicados no hay diferencias en ninguno de los laboratorios.

La tabla 9 presenta los parámetros de precisión del sistema *Diramic* (SCD) por nivel para la estimación del conteo total de microorganismos mesófilos aeróbicos. En la SCD los parámetros variaron con el nivel de contaminación, tanto en la repetibilidad como la reproducibilidad, observándose que la  $S_r$  se corresponde con la encontrada en el primer estudio y la  $DSR_{Gr}$  oscila desde un 33.6 % en el nivel 1 hasta un valor extremadamente alto en el nivel 4. La  $DSR_{Gr}$  varió desde 150 en el nivel 1 hasta 1188 en el nivel 4.

Tabla 8. Significación estadística de la varianza del sistema *Diramic* por nivel de contaminación ( $p \leq 0.05$ ).

Variable	Método	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
Intramuestra	SCD	<b>0.479</b>	<b>0.574</b>	<b>0.298</b>	<b>0.452</b>
Intralaboratorio	SCD	0.001	<b>0.235</b>	<b>0.051</b>	<b>0.571</b>
Interlaboratorio	SCD	0.001	0.020	0.001	<b>0.082</b>

Leyenda: SCD= Estimación del conteo por el Diramic

Tabla 9. Resultados de los parámetros de precisión del estudio colaborativo para estimar el conteo total en muestras de leche cruda.

Niveles	Métodos	Media	Sr	DSRGr	SR	DSRGR
1	SCD	7.34	0.126	33.6	0.396	148
2	SCD	7.06	0.192	55.6	0.650	346
3	SCD	5.48	0.441	176	0.741	450
4	SCD	3.64	1.210	<b>1521</b>	1.106	<b>1188</b>

Leyenda: SCD= Estimación del conteo por el Diramic

Sr=Desviación standard de la repetibilidad

DSRGr=Desviación standard relativa geométrica de la repetibilidad (r) y la reproducibilidad (R).

La obtención de la dispersión de los datos alrededor de la media en su expresión original partiendo de la Sr y la DSRG de la repetibilidad y reproducibilidad (Tabla 10), arroja intervalos de confianza más estrechos para la metodología utilizando el sistema Diramic en los niveles 1 y 2, aunque en ninguno de los 4 hay cruzamiento entre los mismos.

Los valores de repetibilidad obtenidos en los niveles bajos de conteo son más elevados que los reportados en estudios anteriores. Piton y Grappin, (1991) para la estimación de la flora total en estudio colaborativo empleando 20 muestras y 14 laboratorios hace mención a varios trabajos donde reportan valores de DSRGr desde 10.6 % hasta 40.7 %, mientras que para coliformes estos valores pueden llegar a un 66 %. En la reproducibilidad del conteo total se han encontrado valores de 40 y 44 % y cuando han trabajado coliforme los valores se han elevado hasta 120 %. Este mismo autor obtuvo el valor más alto

de Sr en el nivel de  $1.7 \times 10^4$  ufc/mL (0.175), mientras que el 60 % de las muestras se encontraban con Sr superior a 0.1, cuando este análisis se hace con la estimación de los coliformes observamos que con nivel de  $10^2$  ufc/mL la Sr fue de 0.420, estando en todos los casos por encima de 0.11. La SR en este mismo estudio mostró variaciones desde 0.111 a 0.271 en el conteo total, y para coliformes desde 0.156 a 0.530.

Tabla 10. Desviación a partir de los datos originales para la repetibilidad y reproducibilidad del sistema Diramic en estudio colaborativo.

Nivel	Repetibilidad			Reproducibilidad		
	Desviación	r	RD <sub>95</sub>	Desviación	r	RD <sub>95</sub>
1	2.18x10 <sup>7</sup> 2.9x10 <sup>7</sup> - 1.62x10 <sup>7</sup>	.35	123	2.18x10 <sup>7</sup> 5.40x10 <sup>7</sup> - 8.79x10 <sup>7</sup>	1.10	11000
2	1.14x10 <sup>7</sup> 1.78x10 <sup>7</sup> - 7.30x10 <sup>6</sup>	.54	246	1.14x10 <sup>7</sup> 5.08x10 <sup>7</sup> - 2.55x10 <sup>6</sup>	1.80	6500
3	3.01x10 <sup>5</sup> 8.30x10 <sup>5</sup> - 1.09x10 <sup>5</sup>	1.23	1598	3.01x10 <sup>5</sup> 1.65x10 <sup>6</sup> - 5.47x10 <sup>4</sup>	2.07	11400
4	4.37x10 <sup>3</sup> 7.08x10 <sup>4</sup> - 2.70x10 <sup>2</sup>	3.36	2x10 <sup>5</sup>	4.37x10 <sup>3</sup> 5.6x10 <sup>4</sup> -3.39x10 <sup>2</sup>	3.08	125000

Leyenda: RD<sub>95</sub>=Diferencia crítica entre duplicado

r=Repetibilidad

En nuestro estudio y los reportados en trabajos anteriores pueden estar dadas por varios factores, en esos estudios participan laboratorios con un alto grado de preparación y experiencia en el trabajo de la microbiología de la leche, generalmente laboratorios acreditados y con grandes recursos, minimizando factores de variación tales como analista, medios de cultivo, agitación, diluciones etc. Por otro lado han empleado en algunos casos muestras de leche tratadas al calor e inoculadas con un número limitado de cepas a bajas concentraciones. En nuestro estudio utilizamos muestras de leche cruda contaminadas naturalmente de acuerdo a nuestras condiciones y los valores de precisión pudieran ser más reales que si lo hiciéramos con inóculo conocido y

bajo condiciones artificiales, por lo que el estándar de variabilidad establecido, no son reales para los laboratorios que analizan leches fluidas bajo nuestras condiciones donde el coeficiente de variación del método de referencia en leche puede variar desde un 8.9 hasta un 64.5 (Leiva y Villoch, 1991), criterios que se corroboran cuando se observan los resultados encontrados bajo condiciones controladas del laboratorio coordinador, donde los valores de precisión de ambos métodos se ajustan a los reportado en la literatura (Grappin, 1989).

En la SCD se observa que los parámetros de precisión guardan relación con el nivel de contaminación y el tipo de flora presente, cuando los conteos son altos y la proporción de coliformes dentro del mismo tiene el peso fundamental (Gráfico 7), los valores se encuentran dentro de los rangos reportados (Reybroeck, 1996)

La comparación de las medias de la estimación del conteo en este segundo estudio (Tabla 11), refleja que solamente en los niveles 1 y 2 no hay diferencias entre los métodos (Gráfico 8), sin embargo, cuando valoramos los intervalos de confianza obtenidos se nota que los mismos pueden llegar a definir niveles de contaminación con mayor claridad que el método de referencia donde hay más cruzamiento tanto en la repetibilidad como en la reproducibilidad.

Tabla 11. Resultados del estudio colaborativo 2. Comparación de los resultados por nivel.

	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
CSP	7.43 <sup>a</sup>	7.32 <sup>a</sup>	6.63 <sup>a</sup>	5.81 <sup>a</sup>
SCD	7.34 <sup>a</sup>	7.06 <sup>a</sup>	5.52 <sup>b</sup>	3.64 <sup>b</sup>

Leyenda: Letras difieren para  $p \leq 0.05$

En este comportamiento notamos que en los niveles en que se distancian los conteos tienen un menor peso dentro de la carga total los gérmenes coliformes, elemento comprobado en el estudio colaborativo número uno donde se aprecia que no existen diferencias significativas entre los métodos, pero en este caso la proporción de los coliformes es mucho más elevada.

En ambos estudios se noto una estrecha relación entre los métodos según el nivel de contaminación ( $r > 0.92$ ) y cuando trabajemos con bajos niveles, podría corregirse el estimado del CSP, ya que los métodos indirectos de estimación pueden verse influenciados por estos factores de proporción de géneros microbianos dentro del conteo total (Lunder, 1996). Considerando que la turbidimetría es un método dinámico de monitoreo de la actividad microbiana y la misma es susceptible a cambios como consecuencia del nivel de contaminación y del tipo de poblaciones bacterianas, para definir la Sr se

procedió a tomar los resultados de los dos estudios colaborativos y relacionar las Sr y SR de cada uno de los métodos con las medias por niveles, notándose una estrecha correlación en función del nivel de contaminación, obteniendo las ecuaciones que se reflejan en la Tabla 12. Partiendo del ajuste de la relación notamos que hay una gran dependencia entre las variables relacionadas y pudiera ser empleada para definir la precisión en los laboratorios.

Tabla 12. Definición de Sr y SR para cada método.

Sistema Diramic	
Sr = -0.936 m - 0.943	R2= 0.988
SR= -0.111 m - 1.148	R2= 0.968
Método de referencia	
Sr= -0.172 m - 1.846	R2= 0.918
SR= -0.192 m - 2.022	R2= 0.964

En sentido general solo se nota una ligera diferencia favorable al sistema Diramic en el ajuste de la Sr por tanto, partiendo de esta ecuación cada laboratorio puede obtener los valores para su control interno en el trabajo con ambos métodos.

A pesar de que los ensayos de evaluación de la metodología de trabajo desarrollada con el sistema *Diramic* bajo condiciones controladas de laboratorio y mediante estudio colaborativo se extendieron hasta muestras de leche cruda de plantas, consideramos necesario ampliar el estudio para tener un criterios más amplios de la calidad bacteriológica real de la leche cruda en el país y observar aspectos operativos en la manipulación del sistema en condiciones de producción.

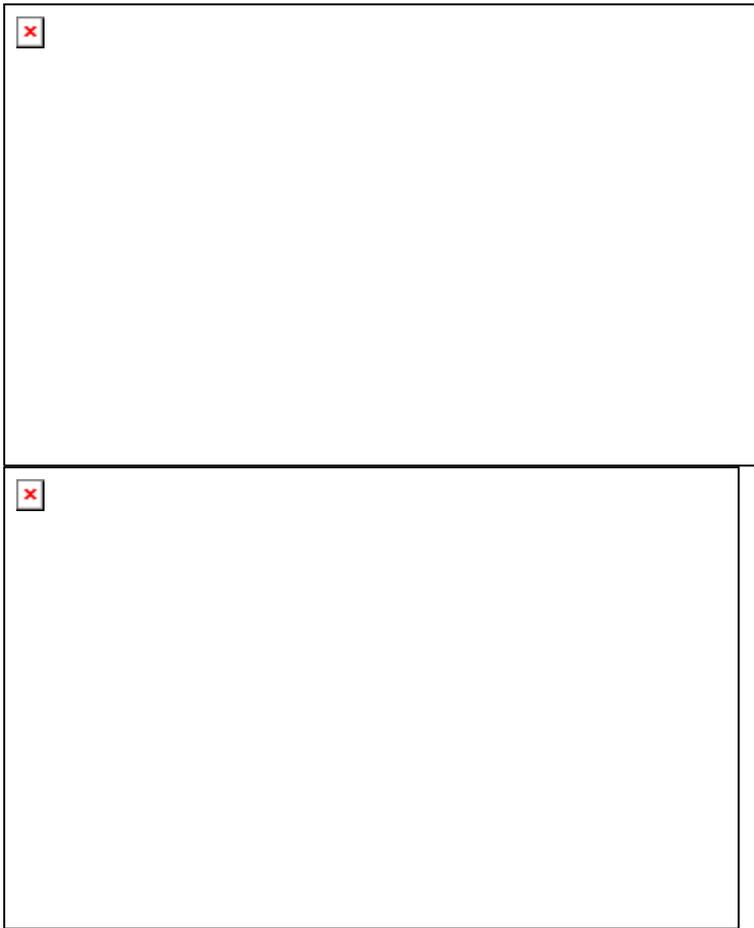


Figura 1. Análisis de consistencia del Sistema

Diramic para estimar el conteo total de bacterias.

### Experimento 3

#### 3.3- Utilización del sistema Diramic bajo condiciones de producción

### 3.3.1- Materiales y métodos

**Muestras:** Se seleccionaron 4 cuencas lecheras de importantes en el país, para evaluar mediante la metodología de trabajo con el sistema *Diramic* la calidad microbiológica de la leche cruda, correspondiéndose con el Occidente, Centro y Oriente, las muestras fueron tomadas a la llegada de los carros colectores a las plantas procesadoras e inmediatamente se remitieron a los laboratorios adjuntos (4) donde estaban ubicados los equipos, siguiendo para ello los procedimientos descritos en los materiales y métodos generales. Las muestras fueron procesadas dentro de las 12 horas.

**Análisis de las muestras:** La calidad microbiológica de las muestras de leche cruda se evaluaron y clasificaron por el sistema *Diramic* en un 100 % de los casos (n=628), teniendo como criterio los resultados de la curva de calibración obtenida con la metodología de trabajo desarrollada en el ensayo número uno, mientras que por el método de referencia (CSP) se evaluó el 78% de ellas (n=486) y para tener uno criterios del nivel de coliformes totales se trabajó un 18 % (n=116). En el análisis se incluyó además la prueba de reducción del azul de metileno (TRAM), (NC-78-11-1983) con el objetivo de la relación entre ellos.

**Microflora:** A un 5 % de las muestras (31) se les hizo un aislamiento de las cepas predominantes, las cuales se analizaron microscópicamente. Para ello las colonias fueron sembradas en superficie de Agar Nutriente e incubadas durante 24 - 48 horas a 30°C y a partir de los cultivos puros se procedió a realizar la tinción de Gram.

### 3.3.2- Resultados y discusión

El estudio efectuado en las diferentes cuencas lecheras, demostró que el nivel de contaminación bacteriana de la leche era elevado, encontrándose las medias por encima del parámetro de especificación ( $1 \times 10^6$  ufc/mL) establecido para leche cruda (Tabla 1), observándose que solo en la Zona C el comportamiento entre los métodos es de significación estadística ( $p < 0.05$ ).

Tabla 1. Calidad microbiológica de la leche acopiada por Zonas (ufc/m  $\log_{10}$ ).

Zonas	CSP			SCD		
	N	Media	Ds	N	Media	Ds
A	139	6.82 <sup>a</sup>	0.68	183	6.81 <sup>a</sup>	1.2
B	49	7.77 <sup>a</sup>	0.69	114	7.21 <sup>a</sup>	0.86
C	143	7.92 <sup>a</sup>	0.98	127	6.24 <sup>b</sup>	1.3

D	85	6.48 <sup>a</sup>	0.93	110	6.20 <sup>a</sup>	1.7
General	486	7.23 <sup>a</sup>	1.1	628	6.63 <sup>a</sup>	1.3

Leyenda: CSP conteo estandar en placa

SCD estimación del conteo por Diramic

Tomando como referencia la clasificación bacteriológica de la leche por la metodología de trabajo con el sistema *Diramic* (Nivel 1=  $<10^4$  ufc/mL, Nivel 2=  $10^4$  ufc/mL -  $10^5$  ufc/mL, Nivel 3=  $10^6$  ufc/mL y Nivel 4=  $\geq 10^7$  ufc/mL), observamos que en el análisis general el conteo estuvo concentrado en niveles iguales o superiores a  $10^7$  ufc/mL (54.48 %) y solo un 30.28% se encuentra en el nivel de  $10^5$  ufc/mL o inferior (Figura 1), nivel que solo se alcanza cuando se mantienen condiciones de higiene adecuadas durante el ordeño, manipulación y transportación de la leche (Res et al, 1992, Groker et al, 1993, Siva et al 1993, Patel et al 1993, Siva y Sannabhadti, 1994, Fuhrmann, 1998, Murphy, 1998).

Asumiendo que los conteos predominantes son elevados se redefinieron cuatro categorías y se hizo una nueva clasificación ajustando los resultados de acuerdo a la estimación del número de ufc/mL por el sistema *Diramic* (Tabla 2), manteniéndose concentradas la mayor cantidad de muestras en el nivel más alto. Cuando se evalúa la proporción de muestras que se incluyó en cada uno de los niveles (Figura 2), por ambos métodos (SCD vs SPC), observamos que no hay diferencias significativas entre ellos ( $p < 0.05$ ).

Tabla 2. Distribución de las muestras según nivel de contaminación SCD ( $\times 1000$  ufc/mL  $\log_{10}$ ).

Nivel	n	Media	DS	CV
Menor 500	108	4.27	1.00	23.4
500-6 500	116	6.07	0.27	4.4
6 500-10 000	82	6.77	0.15	2.1
Más de 10 000	327	7.56	0.29	3.7

Los valores medios obtenidos en algunos de los niveles tienden a subestimar el CSP por el sistema *Diramic*. Esta subvaloración en la evaluación general es de un 8.27% pero se hace más elevada cuando los niveles de contaminación decrecen (Figura 3). Este mismo comportamiento fue observado en el estudio colaborativo, y en ello influye considerablemente el tipo de flora que esté predominando, generalmente cuando los conteos son bajos predominan micrococcos y otros microorganismos Gram positivos que tienen mayores tiempos de duplicación que las bacterias Gram negativas, que son las más frecuentes en leche de baja calidad, otro elemento a tener en cuenta es el peso de la microflora psicrófila, la cual tiene una menor manifestación turbidimétrica que los gérmenes mesófilos, comportamiento que es reconocido cuando se emplean métodos indirectos con principios de medición diferentes al del método de referencia (Grappin, 1989, Reichmuth et al, 1996) y se ha estado presentando en la estandarización del Bactoscan en la CEE (Lunder y Brenne, 1996, Zangeri et al, 1996).

La mayor contaminación estuvo representada por gérmenes coliformes, con media superior a 7 log<sub>10</sub> ufc/mL en las 116 muestras analizadas por el conteo en placa (Figura 4), demostrando que en su obtención no se cumplen las medidas higiénicas necesarias para manipular leche de buena calidad. El 75% de las muestras clasificadas por la metodología del *Diramic* para el conteo total se localizan por encima del límite dado por la norma cubana de especificaciones (38-02-07,1997) para leche cruda (1x10<sup>6</sup> ufc/mL), valor que se corresponde con la reportada por otros autores cubanos (Cabrera y Alvarez, 1997, Rodríguez et al, 1998) y los mismos reflejan la situación objetiva y subjetiva existente en la mayoría de las lecherías del país: escasez de insumos para la higienización con la consiguiente pérdida del hábito de hacerlo cuando se tiene, poca estimulación para elevar la calidad del producto y dificultades en la modernización de la industria así como la existencia de un mercado regulado sin categorías. La posible introducción de un nuevo sistema de pago que estimule más la calidad y penalizar los incumplimientos de especificaciones debe ser un paso importante en un futuro mediato para los programas de mejora de este indicador (Ponce, 1998).

El estado higiénico de la leche cruda acopiada en las cuencas estudiadas, pudiera repercutir en la salud del consumidor ya que constituye un riesgo, fundamentalmente para aquellos casos que consumen leche cruda, situación que se da en diferentes Zonas del país. Por otra parte, recuentos elevados predicen la posibilidad de que el alimento se descomponga, ya que cuando los conteos están entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>8</sup> ufc/mL el deterioro del producto se acelera, situación que generalmente encontramos en muchos países del tercer mundo.

La mayoría de los países de ganadería eficiente están en estos momentos comercializando leche cruda con conteos totales de bacterias en el nivel de 1x10<sup>5</sup> ufc/mL o menos, por ejemplo, en estudio hecho en diferentes países de la CEE sobre 2,509,090 muestras, solamente el 4.1 % estaba por encima de 1x10<sup>5</sup> ufc/mL (Helimen, 1989, Vasil, 1989), mientras que EEUU regula que la leche contenga menos de 1x10<sup>5</sup> ufc/mL (Philpot, 1996), Dinamarca la considera no satisfactoria si está por encima de 3x10<sup>5</sup> ufc/mL al igual que Nueva Zelanda, mientras que en América: Costa Rica no la recibe en planta si está

por encima de  $1.2 \times 10^6$  ufc/mL y en el Uruguay y Argentina se definen niveles dentro de  $1 \times 10^5$  ufc/mL (Ibarra, 1996), en la práctica no siempre se encuentran estos conteos bajos, Best et al (1996), al evaluar microbiológicamente la leche cruda de una Zona de Chile encontró como conteo total promedio  $1.28 \times 10^7$  ufc/mL, coliformes totales  $9.5 \times 10^2$  NMP/mL y  $4 \times 10^2$  NMP/mL para fecales, tomando los parámetros establecido el 84, 95 y 83 % de las muestras estaban fuera de norma para coliformes totales, fecales y conteo total respectivamente, mientras que Badini et al, (1996) con el objetivo de conocer las características microbiológicas de la leche cruda comercializada clandestinamente en los municipios de Sao Paulo (Brasil), evaluaron 60 muestras de 20 propietarios rurales. Los resultados obtenidos mostraron una ocurrencia de 68.3% (41) y 83.3% (50) de las muestras con conteo total y coliformes respectivamente por encima de los límites máximos establecidos por el ministerio de salud ( $1 \times 10^6$  ufc/mL), situación que ha sido reportada en otros estudios (Soler, 1995, Beloti et al 1998).

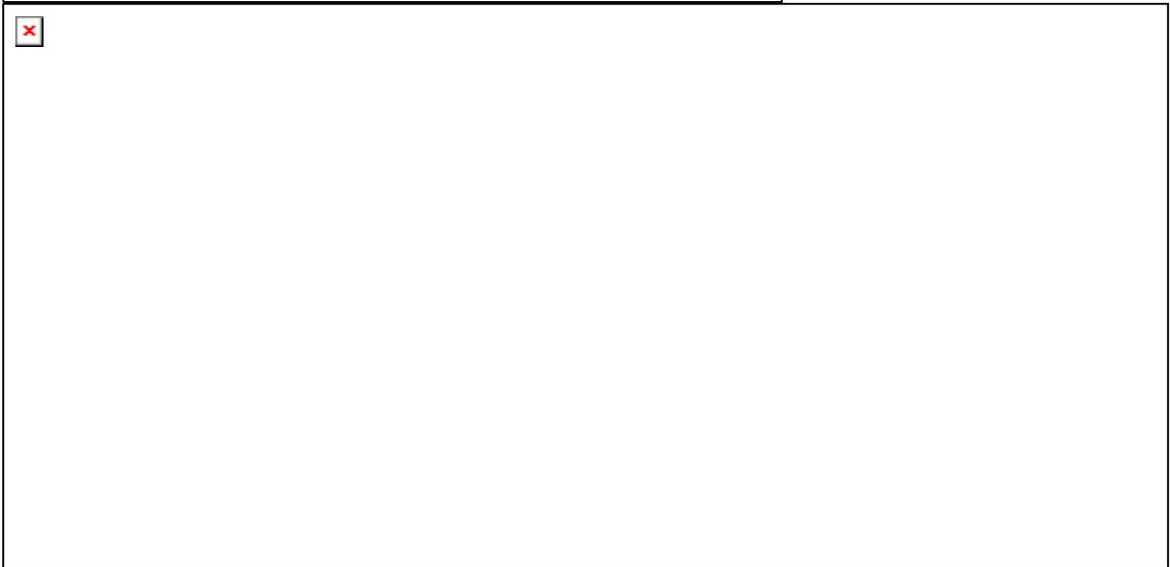
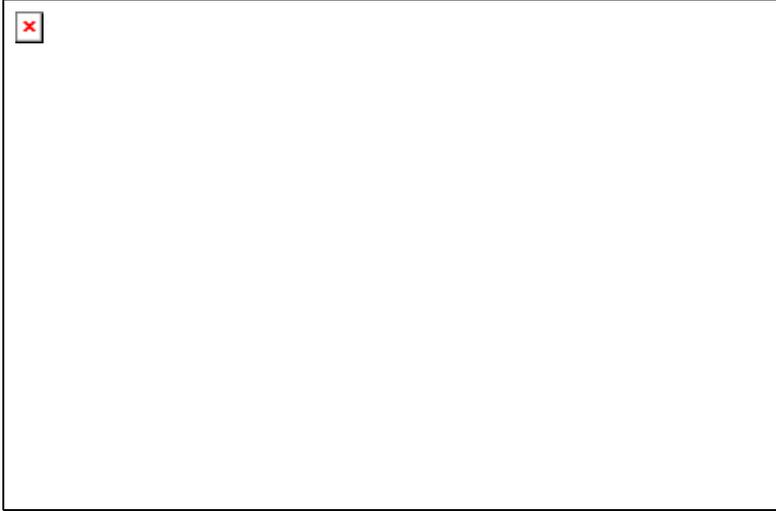
Los resultados del análisis de correlación entre los métodos aunque fueron de significación no se mantuvo constante en todas las Zonas, observándose oscilaciones desde  $r=0.49$  hasta  $r=0.76$ , en ello influyó el grado de familiarización que tenían los analistas con el método de referencia y los niveles de contaminación de las muestras, en el primer caso porque el CSP, no es una técnica de rutina en nuestros laboratorios lácteos y la misma tiene un nivel de error elevado en estos casos, el cual puede verse agudizado cuando se trabajan conteos altos, situación que fue observada en el estudio, donde el mayor porcentaje de las muestras tenían conteos iguales o superiores a  $10^7$  ufc/mL, existiendo ocasiones en que el conteo se hizo impreciso por el elevado número de colonias en las placas. Los mejores resultados de correlación se corresponden con los laboratorios que mayor experiencia han tenido con ambos métodos, Zonas C ( $r = 0.75$ ) y D ( $r = 0.76$ ). Las  $S_{xy}$  encontradas fue de 0.32 y 0.27 respectivamente, resultados que se corresponden con el encostrado en el estudio de calibración del sistema en el ámbito del laboratorio.

Buscando combinaciones de las muestras trabajadas por cada Zona para notar su influencia sobre el nivel de correlación, observamos el mejor resultado cuando se valoró la zona A con la D. El valor de correlación alrededor de 0.7 con oscilaciones de la  $S_{xy}$  entre 0.32 y 0.27 es el que más ha predominado durante todos los ensayos, viéndose favorecido o deprimido en función del tipo de microorganismo presente y el nivel de contaminación, esta misma situación ha sido reportada en estudios evaluativos de métodos de rutina automatizados o semiautomatizados (Grappin, 1989, Reichmuth et al 1996). Los valores de dichos parámetros fueron mejorando con la experiencia en el trabajo de desarrollo del método de referencia y la manipulación del sistema *Diramic*.

Cuando se estudió la relación del TRAM, ensayo utilizado en el país para clasificar la leche cruda desde el punto de vista microbiológico, con la estimación del conteo por el método de referencia y el sistema *Diramic*, se notó que tuvo un mejor comportamiento con este último, con variaciones desde -0.42 hasta -0.72 y media de -0.62, mientras que con el CSP osciló entre 0.19 y -0.62 con media de -0.52, esta situación pudiera ser explicada por el principio de medición del TRAM que guarda más relación con el sistema *Diramic* que

con el método de referencia, corroborando que no es el ensayo más adecuado para estimar la número de bacterias en la leche cruda (Easter, 1989).

Los principales grupos de microorganismos aislados correspondieron a *Coliformes*, *Pseudomonas*, y *Bacillus* esporulados los cuales fueron encontrados en el 100% de los casos (31), y los *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus* y *Streptomyces* variaron entre un 10 y un 30 %, aislamientos que se corresponden en sentido general con los aparecidos en la literatura (Ryser, 1998).



### 3.4. Conclusiones del capítulo

- Se demostró la efectividad de la metodología desarrollada para la determinación de la contaminación bacteriana de la leche cruda mediante el sistema *Diramic*. Los valores de precisión y exactitud del método son reproducibles y se corresponden con los métodos utilizados internacionalmente.
- La validación del sistema *Diramic* mediante estudio colaborativo posibilita el reconocimiento del mismo para su empleo en Cuba y en otros países.
- La clasificación de la leche cruda en diferentes niveles de contaminación posibilita establecer esquemas de control de calidad mediante este método rápido y semiautomatizado, lo cual fue comprobado bajo condiciones de producción.

## Capítulo IV.

### Desarrollo de la metodología de trabajo con el sistema *Diramic* para su utilización en la detección de la contaminación postpasteurización en leche.

#### Introducción

Como se expuso en el capítulo anterior los nuevos enfoques que en la actualidad se tienen sobre el control de la calidad microbiológica de la leche hacen necesario el desarrollo de técnicas y/o metodologías que permitan dar una respuesta rápida al productor, procesador e incluso al consumidor.

La leche pasteurizada (LP) es uno de los alimentos que dentro del país tiene mayor nivel de comercialización, situación que se repite en el resto de la región, esta práctica de protección al consumidor puede verse fuertemente dañada si sobre la misma no se lleva a cabo un estricto control, ya que su vida útil (VU) se ve reducida por la contaminación postpasteurización (CPP), (Visser y De Groote, 1984<sub>2</sub>; Nieuwnhof y Hoolwerf 1986, Birne et al, 1989, Bishop, 1989).

La CPP predominante en este tipo de leche está representada por bacterias Gram negativas psicrófilas pertenecientes a los grupos de *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* y otros Bacillus Gram negativos cuya temperatura óptima de crecimiento oscila entre 25-30 °C. En menor cuantía incluye además termorresistentes esporógenos tales como *B.cereus* y *B.subtilis*, (White, 1993; Dommett et al 1994, Carmody et al 1995, Muir, 1996<sub>1</sub>). La recontaminación es

influenciada por un gran número de factores, asociados estrechamente entre sí, dentro de ellos se encuentran el efecto residual de la propia leche cruda, funcionamiento del pasteurizador, limpieza y saneamiento de las líneas, tanques de almacenamiento, llenadoras y control de temperatura de almacenamiento.

El control de la contaminación postpasteurización es un aspecto importante del aseguramiento de la calidad de la leche pasteurizada, aunque los criterios de medida varían en dependencia del país e incluso del fabricante. Un factor limitante para los procedimientos de determinación de dicha contaminación y la predicción de su vida útil es la pequeña cantidad de microorganismos presentes en el producto final cuando se cumplen las buenas prácticas de higiene en la fábrica, lo que condujo a utilizar una fase de preincubación (PI) de la muestra junto a la inhibición ya sea en el envase o en un medio selectivo de los gérmenes Gram positivos. El objetivo de la PI es amplificar el número de microorganismos y la intensidad de sus respuestas, (Visser y De Groot, 1984<sub>1</sub>; Nieuwenhof y Hoolwerf 1987<sub>2</sub>, Donnett et al 1994; Muir, 1996<sub>2</sub>). Se ha planteado que lo ideal en la detección de la CPP y la estimación de la VU sería la utilización de la PI más un método rápido de detección (White, 1993). Partiendo de estas premisas se establecieron los siguientes objetivos:

- Establecer las condiciones de medición y determinar las características analíticas de la metodología para la estimación de la contaminación postpasteurización.
- Determinar la relación entre la metodología desarrollada en el ámbito del laboratorio para clasificar la calidad de la leche pasteurizada y el método empleado en el país.

## **Experimento 1**

### **4.1 Determinación de la sensibilidad y parámetros de precisión de la metodología de trabajo con el sistema *Diramic***

#### **4.1.1.- Materiales y Métodos**

##### **1- Contaminación artificial**

**Cepas:** Para el estudio se utilizaron cepas conocidas existentes en el cepario del Centro de Ensayos para el Control de la Calidad de la Leche y sus Derivados (CENLAC), formado por los siguientes microorganismos *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y además se obtuvieron 3 cepas indígenas a partir de 20 aislamientos de muestras de leche pasteurizada proveniente de diferentes plantas procesadoras, las cuales fueron identificadas como cepa Algibe, cepa SS y cepa C. lácteo.

**Preparación del inóculo:** Los cultivos de los gérmenes fueron sembrados con asa bacteriológica en medio de Infusión Cerebro Corazón (BHI) e incubados durante 12 horas a 30°C. Posteriormente se reguló la concentración celular de trabajo por mediciones turbidimétricas, ajustando la concentración a una turbidez inicial de 2340, expresado en valores de medición del sistema *Diramic* y de este se inoculó 1 mL en 9 mL (1/10) de leche descremada reconstituida estéril, efectuándose diluciones seriadas hasta 10<sup>5</sup>. Las cepas se monitorearon de forma individual y en mezcla de los mismos. Finalmente se tomó una cepa de coliforme y se prepararon 6 niveles de contaminación para relacionarlos con los diferenciales turbidimétricos. En todos los casos se utilizaron tres réplicas.

**Lecturas con el *Diramic* y conteo en placa:** Se utilizaron las diluciones seriadas hasta 10<sup>5</sup> y se estudiaron como muestras independientes las diluciones de 10<sup>3</sup> y 10<sup>5</sup>. En la metodología de trabajo con el sistema *Diramic* en todos los casos se hizo la siembra en duplicado con incubación a 21 y 30°C, efectuando la primera lectura a tiempo cero y posteriormente cada dos horas. La diferencia de turbidez (DT) respecto a tiempo cero reportada por el sistema *Diramic* fue considerada de valor interpretativo cuando este era superior a 200 como valor absoluto (Hernández et al, 1995).

## 2. Determinación de los parámetros de precisión

### Preparación de las muestras para el análisis

Se tomaron 3 muestras de leche pasteurizada recontaminadas y a una de ellas se le sometió a un calentamiento en baño María a 65°C durante 30 minutos para eliminar dicha contaminación, mientras que las dos restantes no recibieron tratamiento previo, quedando representado niveles de contaminación diferente (I, II, III). Cada una de las muestras después de homogeneizada fue subdividida en tres erlenmeyer (250 mL) estériles y analizadas según los esquemas siguientes.

Procedimiento seguido para el trabajo con las muestras de leche pasteurizada		
Esquemas	Momento de la siembra por el sistema <i>Diramic</i>	Momento de la lectura con el sistema <i>Diramic</i>
A	Siembra directa o inicial sin preincubación (SPI).	8 horas
B	Siembra después de preincubar la muestra 6 horas a 30°C (PI 6hrs).	6 y 8 horas
C	Siembra después de preincubar la muestra 15 horas a 25°C (PI 15hrs).	4 y 6 horas

En cada uno de los esquemas para la prueba de repetibilidad se inocularon 20 alícuotas que se leyeron en duplicado a las 0, 4, 6 y 8 horas (T<sub>0</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>6</sub> y T<sub>8</sub>), según el esquema seguido. El procesamiento estadístico seguido se corresponde con el descrito en materiales y métodos generales.

La siembra para el conteo en placa de la flora aeróbica mesófila y de gérmenes coliformes en los esquemas B y C se efectuó antes y después de la preincubación.

## Otros Análisis efectuados

### Físico químico

Acidez: NC-78-11-01:1983. Determinación de la acidez.

pH: NC-78-11-03:1983. Determinación del índice de pH de la leche.

**Vida útil del producto:** Se determinó por evaluación diaria de las muestras mantenidas en refrigeración por debajo de 7°C, teniendo en cuenta para ello la mantención de las características organoléptica, acidez y pH, (White, 1993).

### 4.1.2- Resultados y discusión

En la evaluación de las características morfológicas y tintoriales de cepas aisladas de la leche pasteurizada (20) predominaron los bacilos Gram negativos y Gram positivos, representando las mismas el 70 y 30% respectivamente de las cepas aisladas, este tipo de contaminación es la que se reporta como más frecuente en leche pasteurizada (Dommert et al 1994).

El Medio EC (EC) fue seleccionado para la evaluación de la contaminación postpasteurización (CPP) ya que a diferencia del Caldo Mc Conkey y del Caldo Verde Brillante no posee indicador y el grado de interferencia que produce en el nefelómetro es mínima, además, ha demostrado ser específico para las bacterias coliformes y no coliformes Gram negativos (Nieuwenhof y Hoolwerf, 1986, Panreac, 1995).

La tabla 1 muestra los conteos efectuados a las diferentes cepas antes de iniciar el ensayo, notándose diferencias en los mismos a pesar de haber seguido similares procedimientos y grado de turbidez. Ello indica diferencias en su morfología, tamaño y tiempos de crecimiento.

En el comportamiento de las cepas se observó que las de referencia, reflejan una cinética de crecimiento en el medio para la detección de bacterias totales mesófilas (CSPL) satisfactoria (Figura 1), sin embargo, en el Medio EC apreciamos que *Bacillus subtilis*, *Streptococcus. agalactiae* y *Staphylococcus aureus* y la cepa C. lácteo mostraron inhibición de su crecimiento (Figura 2 y 3) y las cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomona fluorescens* y la de coliforme (Figura 4) describen crecimientos en curvas ascendentes a partir de las 6 horas. Estos datos se corresponden con los hallados por Visser y De Groot, (1984<sub>1</sub>) y Nieuwenhoof y Hoolwerf, (1987<sub>2</sub>); quienes al evaluar la presencia de

recontaminación de leche pasteurizada con un método conductimétrico con grupos indicadores similares, observaron dentro de los medios de cultivo evaluados los mejores resultados con el medio EC.

El crecimiento de la mezcla de microorganismos muestra inhibición cuando se utiliza el medio EC al compararlo con el observado en el medio SPCL (Figura 5). Este comportamiento es de importancia ya que da un estimado del grupo de microorganismo presente si valoramos la calidad bacteriológica de la leche empleando ambos medios.

Tabla 1. Conteo en placa de las cepas analizadas turbidimétricamente por el *Diramic*.

Cepas	Diluciones	
	1/10 <sup>3</sup>	1/10 <sup>5</sup>
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	6.8 x 10 <sup>5</sup> ufc/mL	1.8 x 10 <sup>4</sup> ufc/mL
<i>E.coli</i> 987 p	2.8 x 10 <sup>7</sup> ufc/mL	7.0 x 10 <sup>4</sup> ufc/mL
<i>Staf.aureus</i> ATCC 196	1.3 x 10 <sup>6</sup> ufc/mL	4.4 x 10 <sup>4</sup> ufc/mL
<i>St.agalactiae</i> 27956	4.5 x 10 <sup>5</sup> ufc/mL	2.9 x 10 <sup>4</sup> ufc/mL
<i>Ps.fluorescens</i> (aislada de leche)	8.0 x 10 <sup>5</sup> ufc/mL	1.3 x 10 <sup>4</sup> ufc/mL
<i>Coliforme spp</i> aislada de leche	2.3 x10 <sup>6</sup> ufc/mL	2.3 x 10 <sup>4</sup> ufc/mL
Cepa indígena-S.S	1.6 x 10 <sup>7</sup> ufc/mL	5.1 x 10 <sup>5</sup> ufc/mL
Cepa indígena- Algibe	1.1 x 10 <sup>7</sup> ufc/mL	3.1 x 10 <sup>5</sup> ufc/mL
Cepa indígena C.Lácteo	4.6 x 10 <sup>7</sup> ufc/mL	2.4 x 10 <sup>5</sup> ufc/mL
Mezcla de Cepas	1.1 x 10 <sup>7</sup> ufc/mL	1.9 x 10 <sup>4</sup> ufc/mL

Nota: Todas las cepas fueron sembradas en el medio de CSP.

En las diferentes cepas (conocidas e indígenas) se observa como la reducción del nivel de contaminación por la dilución del inóculo genera diferenciales turbidimétricos con valor interpretativo más tardíamente, existiendo casos como el de *Ps. fluorescens* donde el nivel de 10<sup>4</sup> ufc/mL solo aparece pasado las 14 horas y otros como los coliformes que lo hace entre las 8 y 10 horas (Figuras 6 -8). El efecto de la temperatura a 30°C de incubación (Figura 9) produce incrementos apreciables en los diferenciales de turbidez, superiores en todos

los casos a los observados a 21°C; demostrando que los microorganismos evaluados tienen mayor adaptabilidad a dicha temperatura de crecimiento. Resultados similares a los obtenidos en el ensayo con relación a la dependencia del nivel de inóculo y temperatura de incubación sobre métodos indirectos de medición de la actividad bacteriana han sido obtenidos en otros trabajos (Firstenberg-Eden et al, 1984, Easter, 1989, Muir, 1996<sub>2</sub>).

En la inoculación efectuada a la leche descremada en polvo reconstituida con la cepa de coliforme se observó una estrecha relación entre los diferenciales turbidimétricos y el nivel de contaminación (Tabla 2), comportamiento que se corrobora en el análisis de regresión entre los métodos y donde el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) oscila desde 0.54 a las 6 horas hasta 0.98 a las 12 horas, tiempo en el cual los niveles más bajos ( $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^3$  ufc/mL) logran generar una señal turbidimétrica de nivel interpretativo (Figura 10).

Tabla 2. Relación entre el nivel de inóculo y los diferenciales de turbidez a diferentes tiempos de incubación.

Inóculo ufc/mL	T4	T6	T8	T10	T12	T14
$2.3 \times 10^6$	19	235	994	1894	2174	2188
$1.7 \times 10^5$	9.5	61	400	1305	1669	2175
$2.3 \times 10^4$	12	30	110	617	1566	2115
$1.8 \times 10^3$	0	34	46	219	821	1827
$2.6 \times 10^2$	0	54	57	93	359	1050
$2.2 \times 10^1$	0	20	45	47	78	90

Leyenda: T= representa los intervalos de lectura con el sistema Diramic.

Teniendo en cuenta los diversos factores que pueden influir sobre el nivel de contaminación bacteriana de la leche pasteurizada se tuvo en cuenta, utilizar un medio de cultivo selectivo que permitió detectar microorganismos indicadores que se describen asociados a contaminaciones de la leche (White, 1998) y el uso de diferentes niveles de inóculo mediante variaciones de las diluciones con ensayos a diferentes temperaturas, posibilitó evaluar de forma integrada el comportamiento de la metodología propuesta con muestras reales de leche pasteurizada.

Los resultados del análisis de precisión de la metodología de trabajo con leche pasteurizada reflejan a las 8 horas de incubación en el *Esquema A* medias en el conteo total que difieren entre sí (Tabla 3), en el nivel I con conteo total de

4.3x10<sup>3</sup> ufc/mL y negativo a coliforme. En tales condiciones el diferencial de turbidez (DT) es la mitad de los dos niveles restantes que tienen conteos por encima de 5x10<sup>4</sup> ufc/mL, valor máximo establecido en la norma cubana de especificaciones microbiológica (NC 38-02-07:1997).

Tabla 3. Comportamiento de los parámetros de precisión en el Esquema A.

Nivel	Conteo	Media DT	Sr	r	CVr	Mínimo	Máximo
Conteo total 8 horas de incubación							
I	4.6x10 <sup>3</sup>	454 c	106	300	23	136	772
II	1.5x10 <sup>5</sup>	962 a	94	266	9.8	680	1244
III	1.6x10 <sup>6</sup>	845 b	72	203	8.5	629	1061
Coliformes							
	0	93.4 c	39	111	42	0	210
II	3.9x10 <sup>4</sup>	746 a	83	235	11	495	995
III	3.5x10 <sup>4</sup>	539 b	82	234	15	293	785

Leyenda: DT= Diferenciales turbidimétricos

Sr= desviación standard de la repetibilidad

r= repetibilidad

CVr= coeficiente de variación de la repetibilidad

mínimo y máximo = +/- 3 Sr

Los valores de la Sr y la r se ven reflejados en los coeficientes de variación de la repetibilidad (CVr) que oscila entre 42 – 8.5 %, correspondiendo los valores más altos a los coliformes. Cuando los datos fueron transformados logarítmicamente notamos que la Sr sólo se eleva ligeramente en el nivel I en ambos conteos, influenciado por el nivel de contaminación, mientras que el CVr muestra, en el conteo total, valores entre 4.5 - 1.23 % y en el de coliformes entre 1.96 -2.83 %. Resaltando la DSRGr, que excepto en la variante negativa

a coliforme, refleja valores que se enmarcan dentro del rango del método de referencia.

Con esta metodología de trabajo y el esquema es posible establecer diferentes niveles de contaminación para bacterias totales a las 8 horas, con valores que se ajustan a los reportados por otros autores (Langford, Kroll, 1992, Dommett et al, 1994), así como la contaminación por coliformes si la misma está por encima de  $1 \times 10^4$  ufc/mL, Para niveles inferiores se necesita mayor tiempo de incubación, elemento corroborado en la curva de coliforme obtenida a partir de leche contaminada artificialmente.

En el *Esquema B* (PI 6 horas a 30°C) a las 6 y 8 horas existe correspondencia entre las media de los DT y los niveles encontrados en el conteo total en placa ( $r \Rightarrow 0.95$ ). En ambas horas de lectura (Tabla 4 y 5) el valor medio (DT) del nivel I para el conteo de coliformes se encuentra por debajo de 200 y difiere significativamente de los niveles con conteo que están por encima del limite de especificaciones de calidad establecidos en Cuba para ambos indicadores microbiológicos en dicho producto (NC-78-05.1988, NC-78-02-07, 1997). En esta misma tabla se observa como todos los indicadores de precisión se vieron favorecidos con relación al esquema anterior, posibilitando definir cuando una muestra esta o no en norma. En los datos transformados logarítmicamente se refleja que la Sr y DSRG en todos los casos están por debajo de 0.09 y 10% respectivamente, con excepción de la variante negativa a coliformes.

Tabla 4. Comportamiento de los parámetros de precisión en el Esquema B.

Nivel	Conteo Post-PI	Media DT	Sr	r	CVr	Mínimo	Máximo
Conteo total 6 horas de incubación							
I	$6.8 \times 10^7$	815 c	152	433	18.8	359	1271
II	$3.0 \times 10^8$	1849 b	83	233	4.0	1600	2098
III	$3.5 \times 10^8$	2149 a	43	123	2.0	2020	2278
Coliformes 6 horas de incubación							
I	0	41.0 c	30.8	87	74.5	0	134
II	$2.7 \times 10^8$	2071 a	93.9	265	4.5	1789	2353
III	$1.9 \times 10^7$	1303 b	63.0	178	4.8	1114	1492

Leyenda: DT= Diferenciales turbidimetricos

Sr= desviación standard de la repetibilidad

r= repetibilidad

CVr= coeficiente de variación de la repetibilidad

mínimo y máximo = +/- 3 Sr

Tabla 5. Comportamiento de los parámetros de precisión en el Esquema B

Nivel	Conteo Post-PI	Media DT	Sr	r	CVr	Mínimo	Máximo
Conteo total 8 horas de incubación							
I	$6.8 \times 10^7$	1106 c	128	363	11.6	722	1490
II	$3.0 \times 10^8$	2141 b	61	172	2.0	1958	2324
III	$3.5 \times 10^8$	2229 a	48	136	2.2	2085	2373
Coliformes							
I	0	63 c	38	107	60	0	177
II	$2.7 \times 10^8$	2685 a	82	234	3.08	2440	2932
III	$1.9 \times 10^7$	2178 b	41	117	1.91	2055	2301

Leyenda: DT= Diferenciales turbidimétricos

Sr= desviación standard de la repetibilidad

r= repetibilidad

CVr= coeficiente de variación de la repetibilidad

mínimo y máximo = +/- 3 Sr

El comportamiento de los parámetros de precisión del conteo total por la metodología de trabajo con el sistema *Diramic* en el *Esquema C* (PI 15 horas a 25°C), indica correspondencia en ambos grupos de microorganismos con el conteo en placa (Tabla 6). Los valores de los CVr están en relación con el nivel de contaminación, con valores por debajo del 20 %. En datos transformados  $\log_{10}$  la Sr osciló en el conteo total entre 0.06 -0.007 y en coliformes entre 0.9 - 0.014, mientras que la DSRG no muestra diferencias con relación al esquema anterior.

Los resultados de la prueba de repetibilidad mediante los tres esquemas seguidos permitió definir el grado de contaminación de una muestra de leche pasteurizada considerada en norma tanto para conteo total como para coliformes (NC-78-05.1988) y en aquellos casos que no exista contaminación por coliformes aun aplicando un período de preincubación dichas muestras mantendrán el conteo negativo y el DT en ninguno de los casos tiene media superior a 200, valor mantenido como criterio de interpretación.

En la metodología evaluada resultó de gran importancia la preincubación corroborando que en aquellos casos en que el conteo es bajo (Esquema A) existe gran variabilidad en los resultados de detección de la contaminación y predicción de la vida útil del producto (Visser, De Groot 1984<sub>1</sub> y Nieuwenhoof y Hoolweref, 1987<sub>2</sub> y Muir, 1996<sub>2</sub>; White, 1998).

Tabla 6. Comportamiento de los parámetros de precisión en el Esquema C.

Nivel	Conteo Post-PI	Media DT	Sr	r	CVr	Mínimo	Máximo
Conteo total 4 hrs de incubación							
I	7.5x10 <sup>6</sup>	694 c	113	321	16	359	1033
II	+1x10 <sup>9</sup>	1906 b	63	179	3.33	1712	2090
III	2.3x10 <sup>9</sup>	2151 a	34	98	1.62	2085	2253
Coliformes 4 hrs de incubación							
I	0	30.4 c	38.6	107	125	0	144
II	7.2x10 <sup>7</sup>	1351 a	51.2	145	3.8	1198	1504
III	3.0x10 <sup>7</sup>	484 b	47.0	133	9.7	343	625
Conteo total 6 hrs de incubación							
I	7.5x10 <sup>6</sup>	1351 c	97.0	275	7.19	1060	1642
II	+1x10 <sup>9</sup>	2345 a	52.0	147	2.00	2189	2501
III	2.3x10 <sup>9</sup>	2177 b	49.9	141	2.29	2027	2327
Coliformes 6 hrs de incubación							
I	0	72 c	48.0	135	66	0	216
II	7.2x10 <sup>7</sup>	2584 a	89.0	253	3.5	2317	2852
III	3.0x10 <sup>7</sup>	1831 b	61.8	175	3.4	1645	2017

Leyenda: DT= Diferenciales turbidimetricos

Sr= desviación standard de la repetibilidad

r= repetibilidad

CVr= coeficiente de variación de la repetibilidad

mínimo y máximo = +/- 3 Sr

El conteo en ambos esquemas de PI se incremento en más de 2 logaritmos, y aunque no existió una tendencia estable en los incrementos del número de microorganismos tomando como variables tipo de germen, nivel y esquema de PI (Figuras 11, 12 y 13), si demostró que en aquellos casos donde el nivel de coliformes sea bajo siempre alcanzaría niveles detectable por la metodología que se evalúa.

Después de tres días de mantenidas las muestras de leche pasteurizada en nevera por debajo de 7°C se pudo comprobar que solo se encontraba en norma respecto al conteo total la muestra del nivel I (Conteos de los niveles: I <  $1 \times 10^4$ , II  $1.95 \times 10^7$ , y III  $5.1 \times 10^7$  ufc/mL), la cual mantuvo su vida útil hasta los 6 días mientras que en las dos restante fue de 4 días. Con ello se corrobora que cuando se encuentran altos conteos de microorganismos en leche pasteurizada las mismas no tendrán una vida útil superior a los 7 días aun mantenidas a temperatura inferior a los 6°C (Muir, 1996<sub>2</sub>).

En los análisis de Acidez y pH al final del período de PI (Tabla 7), se destaca en el *Esquema B* la muestra del nivel I la cual esta dentro de los parámetros establecidos (NC-78-11-01:1983, NC-78-11-03:1983), sin embargo, en el conteo total está fuera de norma ( $6.8 \times 10^7$  ufc/mL). Este mismo comportamiento fue observado por Expósito y García, (1998), al evaluar tres marcas de leche pasteurizada y relacionar la acidez titulable con la temperatura de almacenamiento. Las muestras de los niveles II y III del *Esquema B* están fuera de norma a las 6 horas de PI, mientras que a 25°C (*Esquema C*) ninguna resiste 15 horas, aspecto observado con mucha frecuencia en nuestras condiciones. Quedando demostrado que estos indicadores no deben ser tomados como criterio para valorar microbiológicamente las muestras que se encuentran en norma.

Tabla 7. Efecto de la preincubación (PI) sobre el pH y la Acidez de las muestras de leche pasteurizada.

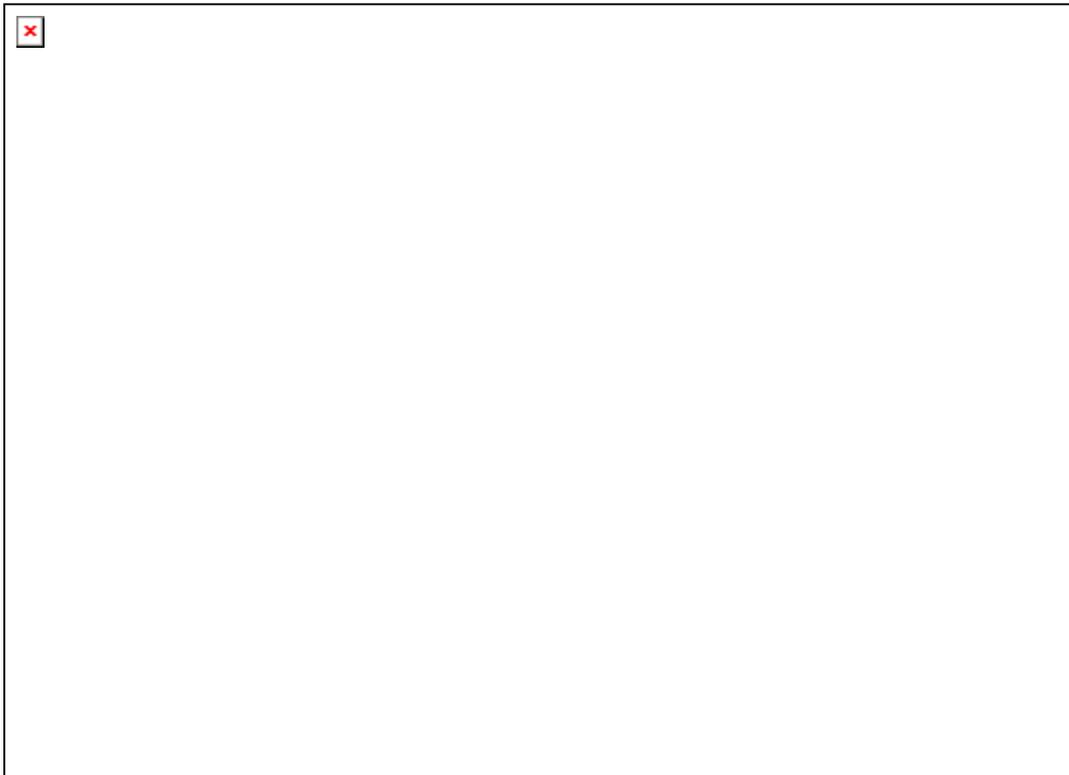
Parámetros	Muestra no PI			Muestra PI 6hs a 30°C			Muestra PI 15hs a 25°C		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
pH	6.6	6.5	6.6	6.5	6.0	5.3	6.5	5.9	5.1

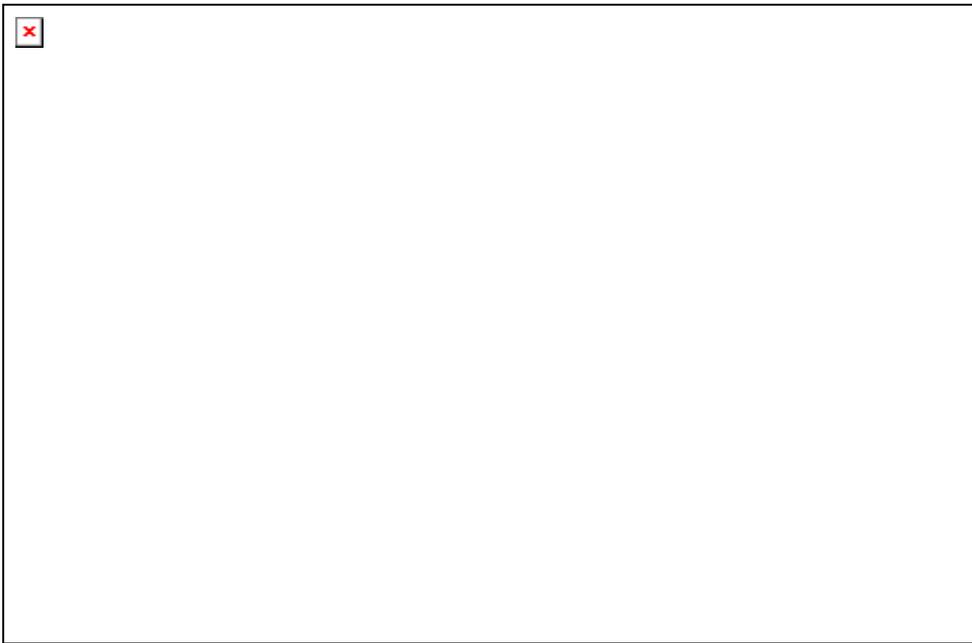
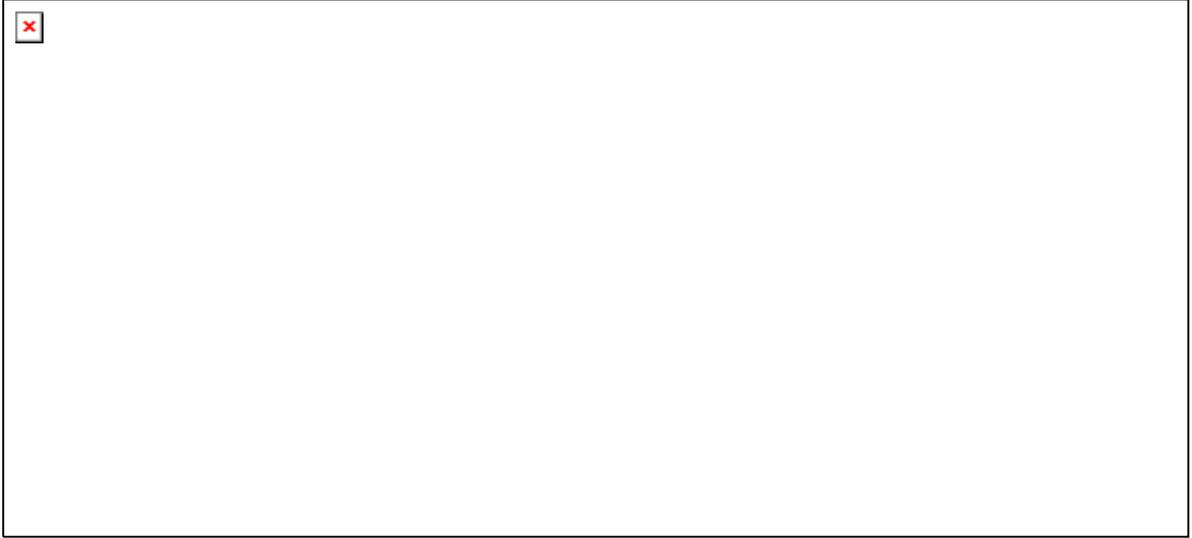
Acidez	.132	.130	.162	.151	.129	.176	.230	.489	.489
--------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

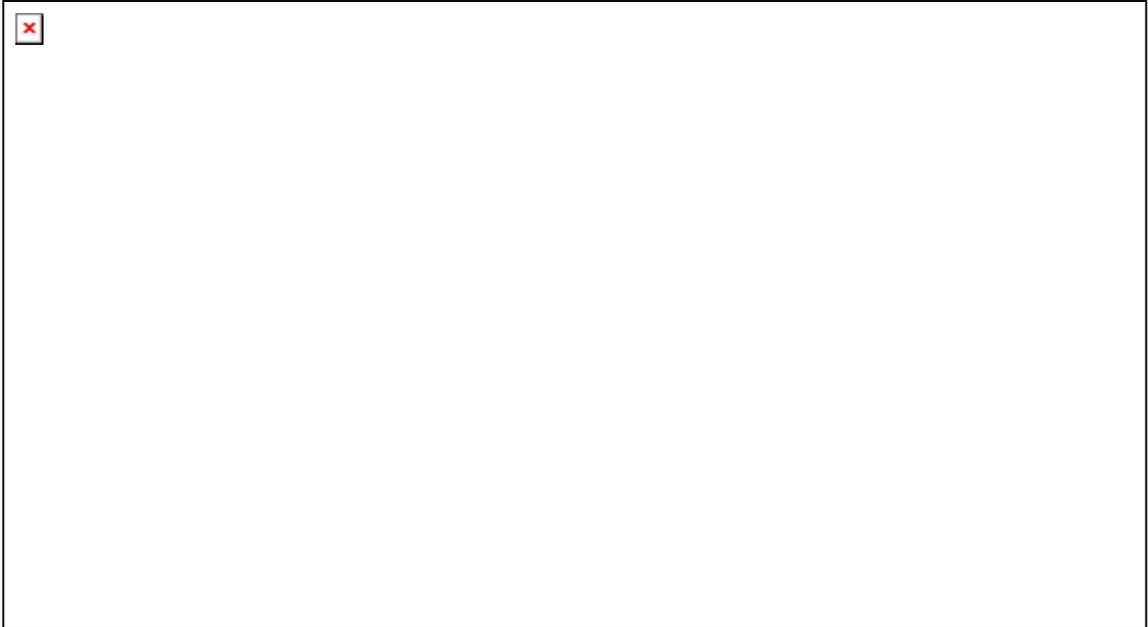
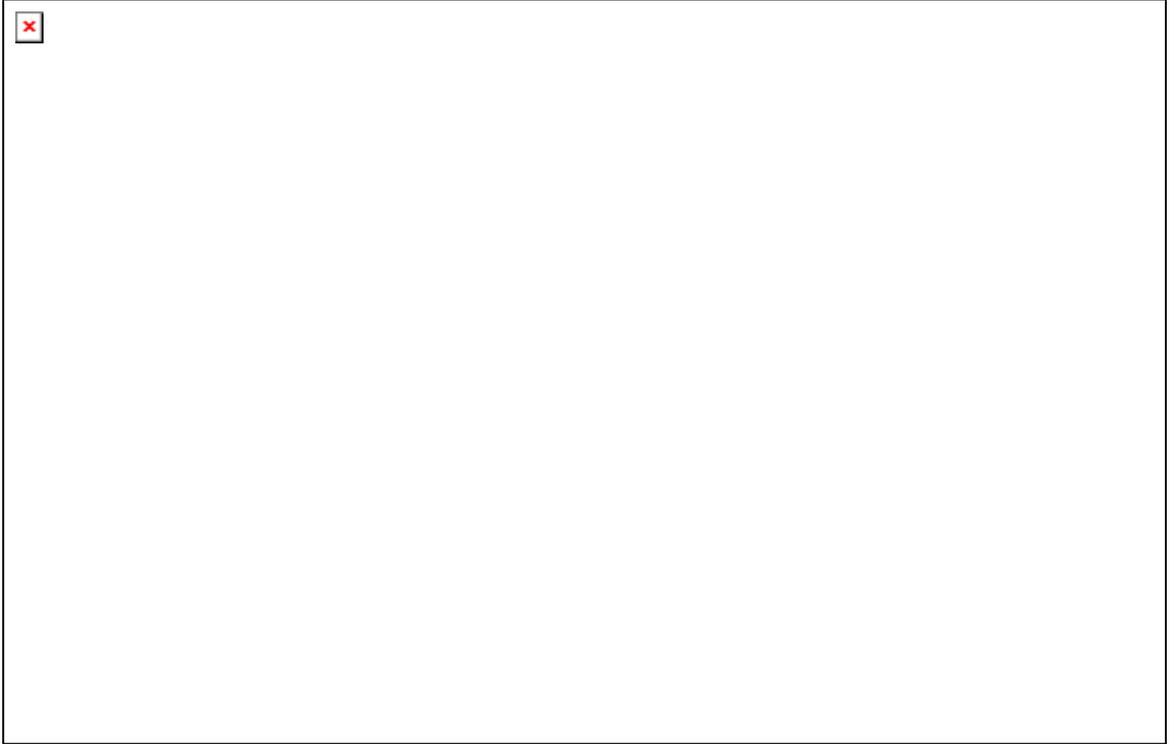
Nota: Acidez: expresada en % de ácido láctico

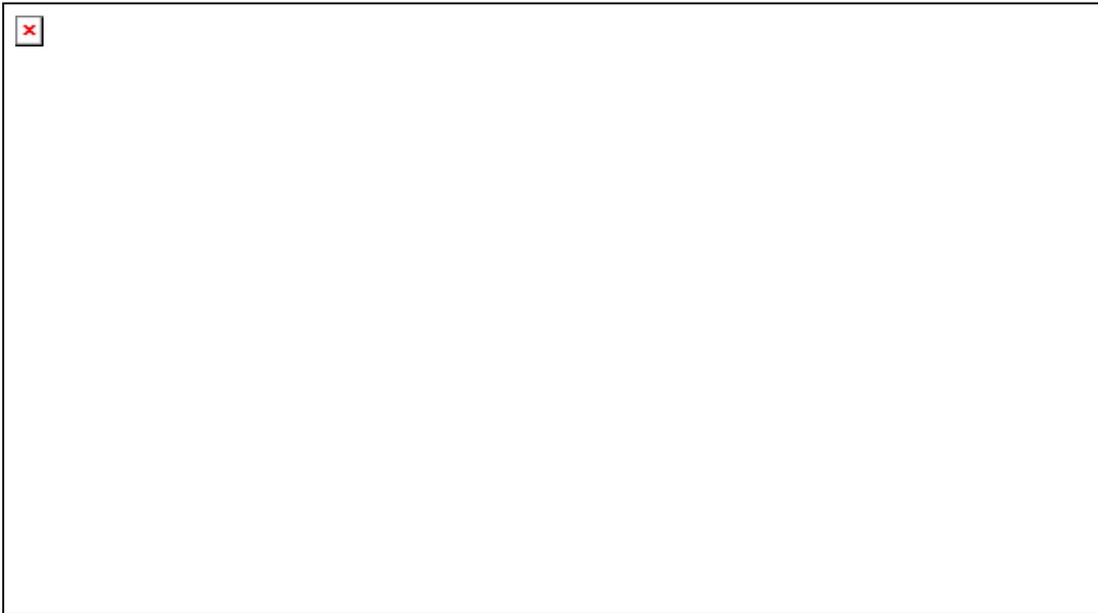
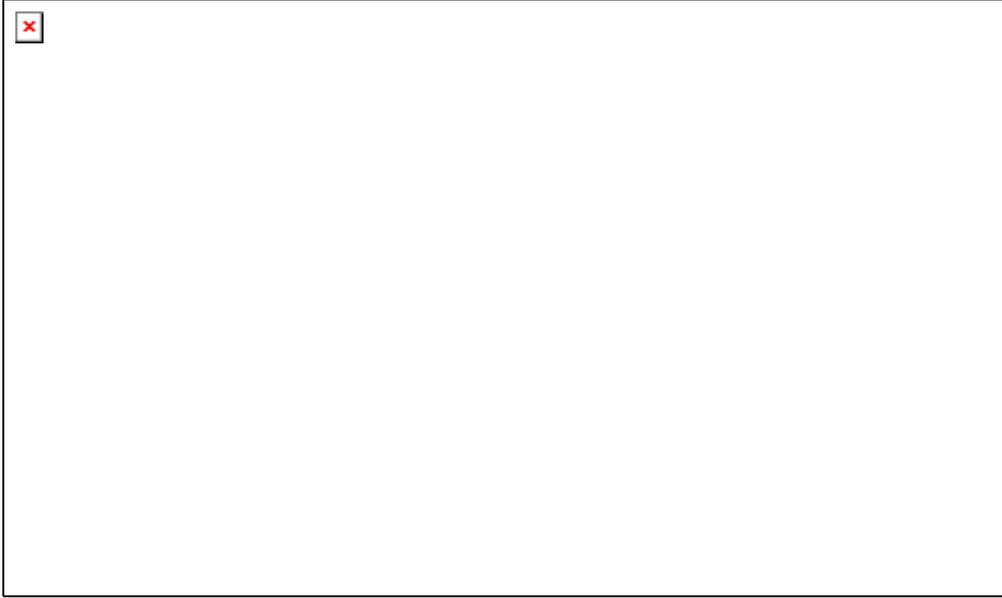
Los esquemas de PI seleccionados se corresponden con las características de nuestro país y condiciones objetivas, en primer lugar la temperatura media anual está sobre los 25°C y por tanto, una amplia gama de microorganismos contaminantes del ambiente de las fábricas puede adaptarse mejor a las temperaturas escogidas, en segundo lugar son pocos los laboratorios de plantas lácteas que tienen incubadoras refrigeradas para mantener preincubada la muestra durante 18 horas a 21°C, procedimiento generalmente visto en la literatura (Bishop, 1998).

En el experimento se determinó a nivel de laboratorio, la sensibilidad y los parámetros de precisión de la metodología de trabajo con el sistema *Diramic* para la evaluación de la contaminación de la leche pasteurizada, definiéndose a partir de los valores máximos (media + 3 Sr) los indicadores para muestras en norma, no obstante, la leche pasteurizada (LP) es obtenida bajo diferentes condiciones, influenciada por las posibilidades objetivas y subjetivas de cada lugar, haciéndose necesario una evaluación en el ámbito de la producción.

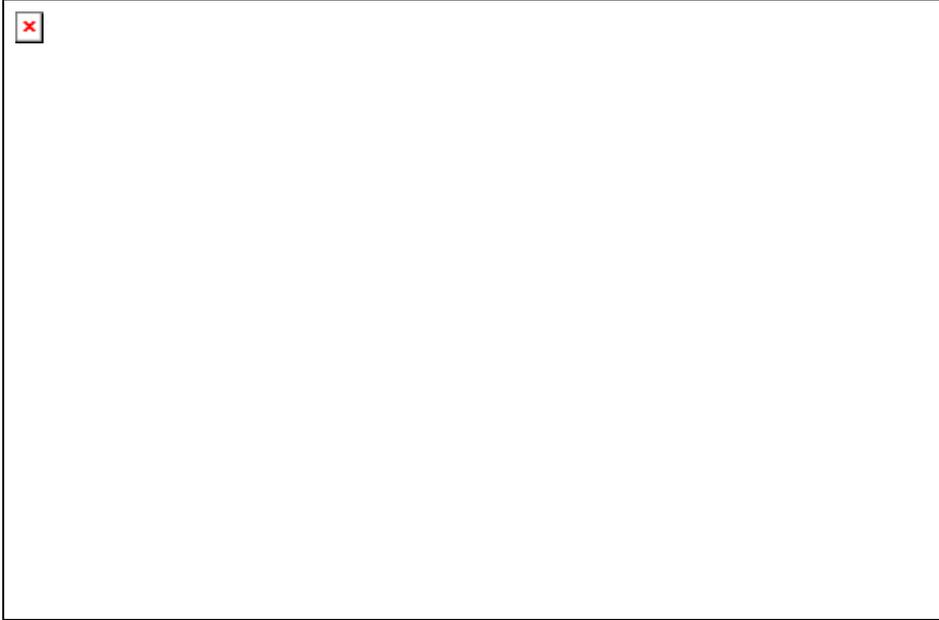




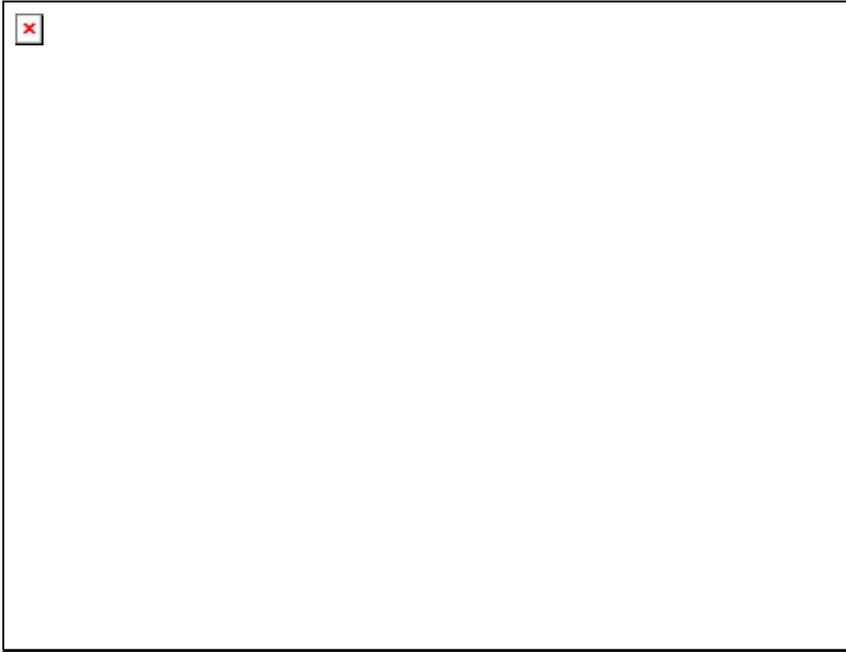












## **Experimento 2**

### **4.2. Aplicación de la metodología en la detección de la contaminación postpasteurización en plantas pasteurizadoras**

#### **4.2.1- Materiales y métodos**

## Muestras para el análisis

Se tomaron muestras en dos Plantas Pasteurizadora de la región (A y B), a partir de diferentes puntos del proceso de producción: Salida del Pasteurizador (SP), Tanques de almacenamiento de leche pasteurizada (TG), Llenadora (LL), Nevera (N). Las muestras fueron trasladadas a los laboratorios de leche (2), donde estaban ubicados los equipos Diramic para proceder con los esquemas descritos en el experimento anterior.

*A-Siembra después de preincubar (PI) la muestra 6 horas a 30°C (PI 6 hrs). Efectuando la intercepción a las 8 horas.*

*B- Siembra después de preincubar (PI) la muestra 15 horas a 25°C (PI 15 hrs). Efectuando la intercepción a las 6 horas*

El número de observaciones para cada esquema fue 127 y 47 respectivamente.

**Análisis.** Para la clasificación bacteriológica de las muestras de leche pasteurizada (NC-78-05, 1988), la siembra de mesófilos y coliformes se efectuó antes de PI las muestras, mientras que por la metodología de trabajo con el sistema Diramic se tuvo en cuenta los indicadores obtenidos en experimento anterior (+ 3 Sr) para clasificar las muestras en norma.

Indicadores para definir las muestras de leche Pasteurizada en norma

Esquema seguido con PI de la muestra	Valor máximo en Diferencial de Turbidez para el conteo total.	Tiempo de lectura con el Diramic
A	1490	8 horas
B	1642	6 horas

**Para Coliforme se considero en norma cuando en los esquemas de PI el Diferencial de Turbidez (DT) era inferior a 200, en los mismos tiempos de lectura.**

La estimación de los valores de sensibilidad, especificidad, y valores predictivo fueron determinados siguiendo el procedimiento descrito por Murray, et al, (1994), asumiendo que las muestras positivas son todas aquellas que

mostraron crecimiento con diferenciales de turbidez superiores a los valores máximos establecidos por la metodología para muestras en norma.

#### 4.2.2- Resultados y Discusión

Las medias generales de los conteos en placa y las mediciones efectuadas mediante la metodología, reflejan que las muestras se ubican en mayor número dentro de la norma de especificidad cuando se valora el conteo total de bacterias que cuando se determina solamente la presencia de coliformes (Figura 3 y 4).

La leche pasteurizada producida en las plantas A y B mostraron diferentes niveles de contaminación, representando en el conteo total las muestras fuera de la norma de especificación el 14% (Planta A) y 49% (Planta B), mientras que en los coliformes se eleva a un 82% y 85.4% respectivamente (Figura 1 y 2). Los coliformes son microorganismos termolábiles y su presencia en la leche pasteurizada es indicativa de recontaminación, elemento corroborado con la metodología de trabajo del sistema *Diramic*. En el monitoreo del flujo de producción de las plantas A y B, se observa como la contaminación por coliformes se eleva considerablemente a partir de la salida de la leche del pasteurizador (Figura 5), ello representa la alarma sobre un indicador de contaminación que puede estar dada por apertura de circuito, limpieza deficiente, o cualquier otra causa de mayor significación higiénica (Alcolado y De Duero, 1989); siendo ineficiente el control de los puntos críticos del proceso de producción (Carmody, 1995). Aunque no debe descartarse la posible influencia que puede tener la leche cruda (Pêsic, 1991), que en nuestro país se conoce que tiene un nivel elevado de contaminación (Rodríguez et al, 1998).

Este nivel elevado de contaminación de la LP no es solo en nuestro país, Beloti et al,(1996<sub>1</sub>) al evaluar microbiológicamente dos tipos de leche pasteurizada en Brasil: desnatada e integral, encontraron en la primera que el 50% de las muestras se encontraban fuera de norma para el conteo total, mientras que en coliformes totales fue de 70%. En la LP integral fue de 10 % para conteo total y 40% para coliformes. Este mismo autor, en otro trabajo sobre leche pasteurizada tipo A, detectó que el 53.33% y 43.33% de las muestras se encontraban fuera de norma respecto al conteo total y coliformes totales respectivamente.

Estudios efectuado durante un año para conocer la calidad microbiológica de las leches Pasteurizadas en Procesadoras de Sao Paulo, reveló que el 18.75% (tipo A) y 41% (Tipo C) estaban fuera de norma para el conteo total, estando implicado en gran medida los gérmenes coliformes (Nader Filho et al 1996), mientras que en inspección microbiológica de 477 muestras analizadas entre 1991 y 1994 en la región metropolitana, de Santiago de Chile, se reporta que el 18.3% de las muestras tenían algún tipo de contaminación, observándose un incremento de la inaptitud en el período de 17.9% en el 1991 a 22.4% en el 1994 (Tamayo et al 1996).

Los resultados obtenidos en este trabajo y los de otros investigadores de la región ponen de manifiesto que las condiciones de obtención no son las

mismas en las diferentes plantas, lo cual puede estar dado por condiciones de higiene inadecuadas en la obtención de la materia prima, contaminación postpasteurización y almacenamiento inadecuado, así como la práctica frecuente en algunos países de subpasteurizar o no pasteurizar la leche en busca de mejorar las características organolépticas de los productos (Clavijo 1991).

En el análisis de los resultados para ubicar las muestras dentro y fuera de norma, se observó que en el conteo total hay diferencias absolutas entre las medias (606 vs 522) pero no tiene significación estadística, no ocurriendo así en el caso de la detección de los coliformes (39 vs 479) donde aún, agrupando las muestras en conteos menores de 100 ufc/mL y en muestras con conteos superiores a 100 ufc/mL, las diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) se mantienen.

La evaluación realizada a las muestras de leche pasteurizada por la metodología de trabajo con sistema *Diramic* tomando como positivo aquellas muestras donde el diferencial de turbidez fuera superior al valor máximo establecido en el experimento anterior (Tabla 1), refleja los mejores resultados de forma integral en el *Esquema* con PI a 30°C durante 6 horas, mostrando una sensibilidad de 84.0 % y especificidad de 81.4 % para el conteo total, mientras que en la detección de los coliformes fue de 95.1% y 86.4% respectivamente. Resultados de especificidad, con rangos entre 85-90%, son reportados por Firstenberg et al, (1984), Visser y De Groot, (1984<sub>1</sub>) y Nieuwenhoof y Hoolwerf, (1986) al evaluar la recontaminación por bacterias Gram negativas en leche pasteurizada empleando el método por conductimétrico.

Tabla 1. Resultados de la evaluación de muestras de LP por la metodología de trabajo con el sistema *Diramic* al compararlo con el método de conteo en placa.

Indicadores	Conteo total de viables		Coliformes	
	Tiempos de preincubación			
	6 horas a 30°C	15 horas a 25°C	6 horas a 30°C	15 horas a 25°C
Sensibilidad	84.0	63.6	95.1	97.1
Especificidad	81.4	68.0	86.4	100
VP en Norma	69.2	64.0	97.0	100
VP Fuera de Norma	90.9	68.0	79.1	85.7

Leyenda. V.P= Valor Predictivo

Los valores de sensibilidad del esquema con PI 15 horas en el conteo total son más bajos que los de la PI a 6 horas y en ello puede influir la carga inicial de las muestras al provocar que los microorganismos alcancen un alto nivel de concentración que influyen negativamente sobre la precisión del esquema y por otro lado el número de muestras trabajadas con este esquema fue menor. En los falsos positivos (fuera de norma), influyó considerablemente el nivel de contaminación por coliformes ya que en las muestras detectadas el 80 % de los casos tenían conteos elevados de estos microorganismos.

En el desarrollo del experimento se dieron casos (10.71 %) que las muestras resultaron negativas a la prueba de coliforme y positiva para la metodología desarrollada, ello esta relacionado con debido a que no todas las bacterias Gram negativas fermentan la lactosa y si pueden considerárseles como contaminantes postpasteurización, por otra parte constituye un reflejo de las dificultades propias de los muestreos con bajos niveles de contaminación. Existe la posibilidad de que las muestras seleccionadas no tengan contaminación postpasteurización lo que unido a la variabilidad del conteo en placa y al uso de Agar Violeta Rojo Bilis (AVRB), medio recomendado para los productos lácteos, donde se discrimina teniendo en cuenta la cantidad, los coliformes dañados por la elevada temperatura generalmente no se pueden recuperar (Dommett et al 1994). Elemento que no se tiene en cuenta en muchas plantas, que hacen la siembra inmediatamente después de la pasteurización.

La contaminación de la leche pasteurizada por coliformes es una problemática en la mayoría de los países que comercializan la misma por lo que disponer de un método rápido de detección de la contaminación postpasteurización ofrece mucha información al respecto, máxime conociendo que los diferentes métodos de monitoreo presentan sus limitantes (Busta et al, 1992, Lanford y Kroll, 1992). La metodología ensayada reduce el trabajo asociado al procesamiento de las muestras, el tiempo en que se obtienen los resultados es menor y permite ahorrar materiales, siendo por tanto un método económico a utilizar en laboratorios de pocos recursos como los de nuestro país y muchos otros de la región.

Los resultados del análisis de la vida útil (Tabla 2 y 3), indican que las muestras se mantuvieron en todos los casos aptas para el consumo hasta pasado los tres días tiempo establecido en la norma cubana (NC-78-05: 1988) para este producto. No obstante las muestras con vida útil de 4 días están fuera de límites respecto al conteo total y a las que tienen 5 y 6 días muy próximos a este, mientras que los coliformes (10 ufc/mL) están fuera de norma en todos los casos.

Tabla 2. Diferencias entre los grupos de acuerdo a los días de vida útil (VU).  
 Conteo total de mesófilos 30°C.

Vida útil (días)	N	%	ufc/mL	DT
------------------	---	---	--------	----

7	17	21	$6.5 \times 10^{3a}$	138 <sup>a</sup>
6	12	15	$3.8 \times 10^{4b}$	692 <sup>b</sup>
5	34	42	$4.9 \times 10^{4b}$	631 <sup>b</sup>
4	18	22	$1.2 \times 10^{5b}$	1347 <sup>c</sup>

Leyenda: Letras diferentes en una misma columna difieren significativamente  $p < 0.05$ .

Tabla 3. Diferencias entre los grupos de acuerdo a los días de vida útil (VU).  
Conteo de coliformes a 30°C.

Vida útil (días)	N	%	ufc/mL	DT
7	17	21	$2.6 \times 10^{1a}$	119 <sup>a</sup>
6	12	15	$1.1 \times 10^{2b}$	841 <sup>b</sup>
5	34	42	$9.3 \times 10^{2b}$	772 <sup>b</sup>
4	18	22	$2.3 \times 10^{2b}$	1497 <sup>c</sup>

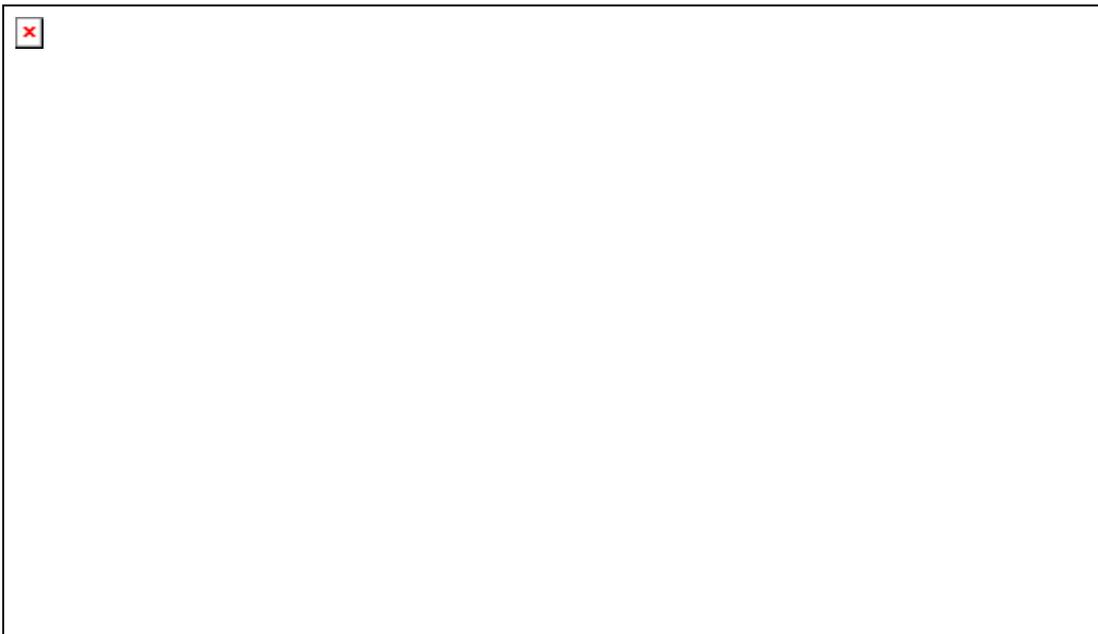
Leyenda: Letras diferentes en una misma columna difieren significativamente  $p < 0.05$ .

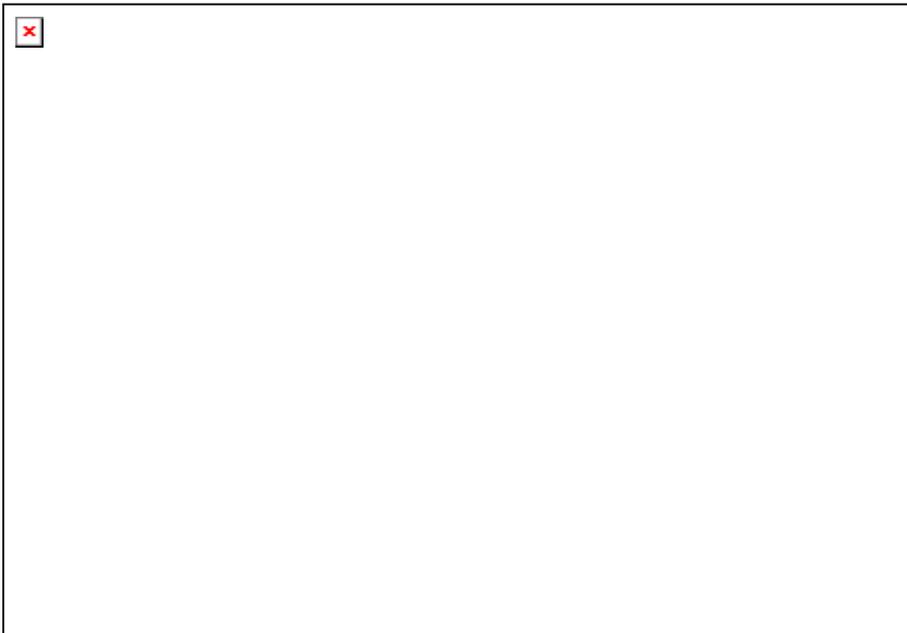
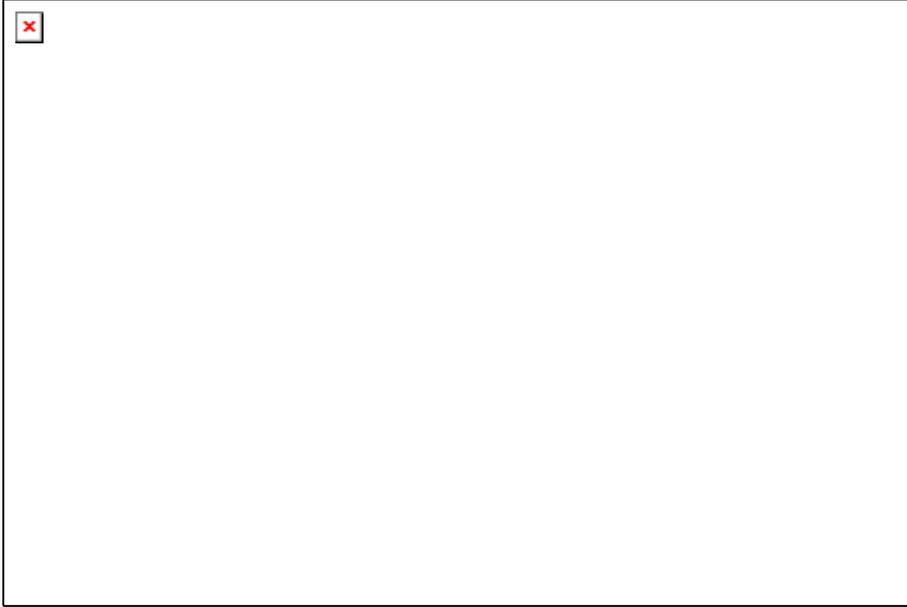
El máximo de días de vida útil fue de 7 días, resultados similares encontraron Carmody et al. (1995) al evaluar diferentes marcas de LP, mientras que en otros trabajos se reportan hasta 21 días, (Plaksanguansci, 1991, Ravanis y Lewis 1995), en estos casos se ha partido de una leche cruda de excelente calidad y han sido procesadas bajo muy buenas condiciones higiénicas.

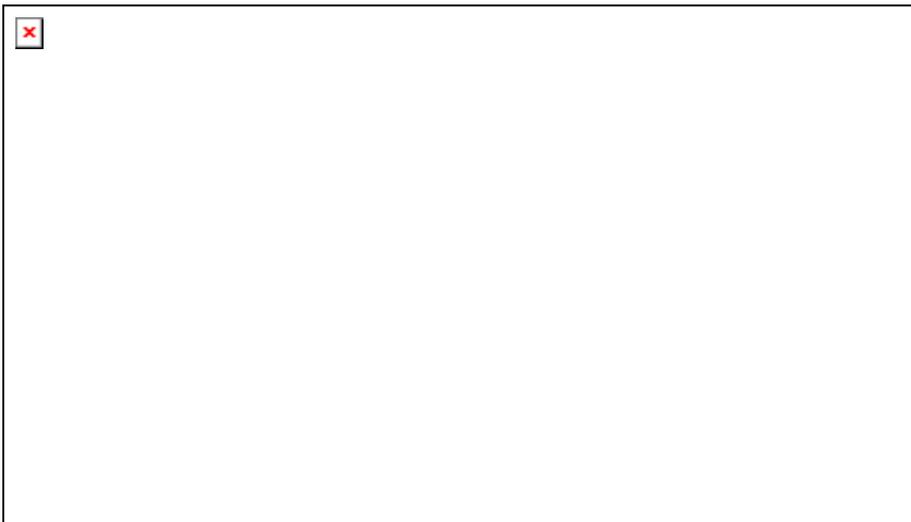
Cuando fueron comparados los valores medios de los métodos, observamos que existieron diferencias entre los conteos de las muestras con 7 días y el resto mientras que con el sistema *Diramic* fue posible definir la vida útil de la leche pasteurizada y clasificarla en diferentes categorías: leche pasteurizada con menos de 4 días, entre 5 y 6 días y más de 7 días de vida útil (Figura 6).

La contaminación postpasteurización es la responsable en la mayoría de los casos del acortamiento de la vida útil de la leche pasteurizada. Por ello es importante disponer de métodos que sean capaces de detectar estas contaminaciones con el fin de definir la problemática y tomar las medidas correctivas a tiempo. En la actualidad existen varios métodos con estos fines y los mismos tienen ventajas y desventajas. (Niewenhoof y Hoolwerf, 1987<sub>2</sub>). De

esta forma consideramos que la metodología desarrollada para el sistema *Diramic* se enmarca dentro de las sugerencias hechas para predecir la vida útil: preincubar la muestra y posteriormente emplear un método rápido de detección (Muir, 1996<sub>2</sub>, White, 1998).







#### 4.3. Conclusiones del capítulo:

- El desarrollo de la metodología de análisis de leche pasteurizada mediante el sistema *Diramic*, permite la detección de diferentes niveles de contaminación de la misma con una adecuada sensibilidad y especificidad.
- El uso del sistema *Diramic* permite la ubicación de las muestras de leche pasteurizada dentro y fuera de norma con un alto nivel de coincidencia tanto para el conteo total de mesófilos como en coliformes.
- Los períodos de preincubación escogidos reducen el tiempo para detectar la contaminación pospasteurización y se logra una mejor predicción de la vida útil de la leche pasteurizada que el método establecido en el país.

## **CAPITULO V**

### **DISCUSIÓN GENERAL**

La seguridad alimentaria constituye un tópico de primerísima importancia para los organismos reguladores internacionales y nacionales, de salud pública y del área de procesamiento y distribución de alimentos entre otros.

La leche cruda y pasteurizada, son alimentos de un alto consumo por la población mundial con énfasis en los países en vías de desarrollo, a diferencia de los desarrollados que se caracterizan por un mayor consumo de leche ultrapasteurizada (UHT), y otros derivados lácteos. La contaminación microbiológica de ambos productos es un factor de riesgo para el consumidor de mayor sensibilidad que en el caso de Cuba se trata prácticamente de niños y ancianos.

La importancia sanitaria e industrial de que los resultados del análisis microbiológico de la leche sean obtenidos en tiempos razonables, ha convertido en una necesidad el contar con una gama amplia de métodos de ensayos tendientes a minimizar los pasos de los métodos convencionales o sustituirlos por métodos más rápidos, así como aumentar el número de muestras a analizar (Gatti Neviani, 1993, Buchrieser y Kaspar, 1993, Fung, 1994, Reichmuth, 1996). Los de mayor aplicabilidad en la actualidad son las variantes de DEFT, Bioluminiscencia, Conductividad, Turbidimetría y las modificaciones de los métodos convencionales (White, 1993).

Teóricamente la leche no es apropiada para la técnica turbidimétrica porque se requiere de un sustrato transparente. No obstante, la misma pudo ser analizada a partir de las metodologías desarrolladas con el sistema Diramic al incluir la dilución de la muestra a inocular y un volumen de medio líquido adecuado, alcanzándose una baja turbidez inicial que permitió registrar el crecimiento bacteriano.

En tal sentido los experimentos realizados a nivel de laboratorio con el método turbidimétrico para evaluar la contaminación total de bacterias mesófilas a 30°C en muestras de leche cruda, demostraron la capacidad que tiene la metodología propuesta en dar respuestas en lapsos breves de tiempo, en correspondencia con lo señalado por otros investigadores que sugieren resultados entre 12 y 24 horas (Grappin, 1989, Vasavada, 1993, Noterman y Vel, 1994).

La concordancia de los valores de precisión en términos de Sr, DSRG y correlación con los reportados para otros métodos indirectos (Grappin, 1989, Piton y Grappin, 1991, White, 1993, y Reichmuth et al, 1996) e incluso para el propio propio método de referencia de conteo en placa, establece las bases fundamentales para afirmar que la metodología desarrollada mediante el

sistema Diramic puede ser utilizada con un alto grado de confianza técnica por todos los laboratorios del país e incluso a nivel internacional.

Atributos de los métodos indirectos y su relación con el sistema Diramic.		
Indicador de precisión	Métodos Indirectos	Sistema Diramic.
Sr	0.05 - 0.1	0.01 - .6
Sxy	0.18 - 0.50	.24 - .62
Correlación	+ .90 excelente .80 - 90 bueno .70 - 79 aceptable	.78 - .89
DSR	16.2 - 25.0	6.4 - 29.1
Límite de determinación	$1 \times 10^5$ ufc/mL	$> 1 \times 10^5$ ufc/mL

Un problema frecuente observado en estudios colaborativos realizados por el Centro de Ensayos para el Control de la Calidad de la Leche y sus Derivados (CENLAC), en Cuba y en otros países latinoamericanos es que más del 40 % de los laboratorios participantes se encuentran fuera de los límites de conformidad establecidos para los métodos de referencia, especialmente en el análisis físico - químico (Ponce, 1998). Generalmente los valores de dispersión intra e inter laboratorios para ensayos microbiológicos son elevados, atendiendo a las propias características de los microorganismos y factores de variación de los análisis (Andrews, 1984, Berg et al, 1994). Resultó significativo que en la validación de la metodología de trabajo propuesta, no se encontró ningún laboratorio con valores aberrante a pesar de que los mismos, no tienen una basta experiencia en el análisis de rutina de estos métodos. Es de suponer que el trabajo continuo y sistemático, así como el incremento de la cultura analítica en este campo y que se perfila en el país para un futuro mediato, posibilite ajustar aún más dicha metodología y reducir incluso los factores de variación.

La obtención por primera vez en el país de un material de ensayo con diferentes niveles de contaminación natural y posibilidades de una fácil manipulación, constituyó un elemento de suma importancia porque no solo permite la validación del sistema *Diramic* sino que el procedimiento seguido crea las bases metodológicas para estudios colaborativos posteriores tanto a nivel nacional como internacional y ello constituye un requisito para la

implementación de las buenas prácticas de laboratorio (Andrews, 1987, Berg et al, 1994, Betancourt, 1997)).

Un objetivo central en el desarrollo de los métodos automatizados y/o semiautomatizados es la disminución de los errores asociados al trabajo de los analistas, ya que se establecen operaciones estandarizadas y homogéneas para todas las muestras (Firstenberg-Eden, 1984, Richardson, 1995). Alcanzar este propósito en el caso del análisis microbiológico y especialmente en los laboratorios que no tienen un alto grado de modernización es aún más importante, para la realidad cubana actual en el sector lechero.

La alta correspondencia entre las clasificaciones por ambos métodos (CSP y Sistema *Diramic*) y la mayor concentración de muestras en altos conteos de bacterias posibilita no solo la categoración inicial propuesta con la metodología desarrollada sino también ir redimensionando el punto de intercepción, en la medida que se desee ir cambiando el estándar de calidad higiénico sanitario sobre la base de dicho indicador.

Los métodos automatizados utilizados en países de ganadería más desarrollada como la Unión Europea, Estados Unidos, Canada y en algunos países de América Latina (Uruguay, Argentina), tienen el inconveniente de subestimar el conteo de bacterias en niveles por debajo de  $1 \times 10^5$  ufc/mL, lo que constituye motivo de análisis por algunos autores (Lunder y Brenne, 1996<sub>2</sub>, Zangerl et al, 1996). Como ya se ha señalado el sistema *Diramic* también presenta similares resultados, no obstante, la diferencia fundamental es del orden práctico, ya que en dichos países las regulaciones tienden a incorporar muy bajos conteos de bacterias e incluso microorganismos específicos, a diferencia de Cuba y otros países en desarrollo que lo más importante en la actualidad es sustituir los métodos de reducción y/o de conteo en placa por métodos automatizados o semiautomatizados, pero su nivel óptimo de calidad bacteriológico se encuentra en el rango de sensibilidad y precisión del sistema *Diramic*.

Sin embargo, para el caso de leche pasteurizada con otros indicadores de calidad fue necesario potenciar la capacidad del sistema *Diramic* mediante la introducción de un esquema de preincubación de la muestra asociado a los ajustes en tipos de medios de cultivo y tiempos de incubación. Estos resultados tienen una importante significación tanto técnica como práctica, porque posibilita que una misma tecnología pueda ser utilizada para varios fines: Control de la calidad de la materia prima, evaluar niveles de contaminación y sus posibles orígenes y finalmente estimar la vida útil del producto en el mercado; sin necesidad de cambiar de equipos ni de otros métodos de análisis. La flexibilidad que se demuestra mediante estos resultados no ha sido identificada claramente mediante otros sistemas automatizados, al menos en laboratorios con bajo nivel de desarrollo tecnológico.

Para el caso de Cuba el conteo de bacterias en leche cruda y pasteurizada tiene un particular significado. Basta destacar que la clasificación de leche clase A y B (> 4:30 horas) en las lecherías a través de la prueba de reductasa (TRAM/NRAG 1008, 1988), rebasa el 50% de las mismas (Ponce, 1998). Sin

embargo en el estudio se reportó que solo el 9.67 % de las muestras para conteo total y el 11.02 % para coliformes se encuentran dentro de los valores de especificaciones de la norma cubana (NC 38-02-07, 1997), lo que también tiene relación con las características higiénicas existentes en las plantas procesadoras de leche pasteurizada donde más del 80 % de las muestras analizadas presentó niveles contaminación postpasteurización, por encima de la norma antes mencionada. Esta situación provoca, en no pocas ocasiones, que con los métodos de análisis actuales la leche pasteurizada se distribuya en el mercado y solo después de que esta es consumida, es que el fabricante tiene conocimiento del nivel de contaminación bacteriológico de la misma. (Hernández et al, 1998). Aunque esta problemática es compleja y no se debe reducir solo a una explicación analítica, queda claro la necesidad de profundizar en el trabajo integral de mejora de la calidad higiénico sanitaria en los tres niveles: producción, industria y distribución– comercialización. Esta situación con la calidad de la leche cruda y pasteurizada es válida también para la región de Latinoamérica y otros países de Asia y Africa (Martínez et al, 1993, Slaghuis, 1996, Tamayo et al, 1996, Santos et al, 1996, Lombardo, 1996, Beloti et al, 1998<sub>3</sub>).

Para la industria lechera cubana es muy importante reducir los problemas asociados a la contaminación post-pasteurización, teniendo garantizado de antemano un proceso térmico eficiente. Con ello se evitan los altos riesgos que conlleva la transmisión de microorganismos patógenos a través de la leche, a uno de los sectores de la población de mayor consumo. Para tomar medidas correctivas en este sentido, la metodología desarrollada para leche pasteurizada permite detectar los fallos en toda la cadena, de forma rápida y con una adecuada confiabilidad analítica y permitiría ir materializando nuevos enfoques de control de este producto como lo es el análisis de riesgos y puntos críticos de control (ARPC). La utilidad de estos criterios han sido referido por otros investigadores que han valorado la calidad bacteriológica de este tipo de leche (O Crave y Macauley, 1992, Dommett et al, 1994, Notermans y Veld, 1994, Mc Meekin y Ross, 1996).

Resulta igualmente un elemento interesante los resultados obtenidos del aislamiento de las cepas bacterianas principales en leche cruda y pasteurizada, aspecto que al no haber sido objeto central del trabajo, creemos que debe valorarse extensivamente en el país por la implicación tecnológica que reviste para la industria en nuestras condiciones, ya que posibilitaría su relación con las condiciones de obtención del producto en las unidades (Vanos, 1991, Ternstroem et al, 1993, Mc Guiggan et al, 1994, Carvalho et al 1996, Ribeiro et al, 1996, Ryser, 1998, Murphy y Boor, 1998).

Actualmente es indiscutible que como métodos de referencia siguen permaneciendo los desarrollados en el siglo XIX, basados en la enumeración de células por unidad de masa o volumen. Aunque no siempre exista una relación directa entre las cifras de los análisis y la calidad del producto. En el desarrollo de las metodologías para ambos tipos de leche, se observó la relación entre el nivel inicial de contaminación y los cambios de turbidez generados en los medios de cultivo líquidos, pero el principio de medición del número de células no es el mismo para ambos métodos, diferencia que puede

influir en los parámetros de calidad (Reichmuth et al, 1996). No obstante, el verdadero problema no es sólo el grado de relación entre los resultados de ambos sino también el significado de cada tipo de información sobre la calidad, la inocuidad y la duración de la vida útil o de almacenamiento de la leche, elementos que con los resultados del trabajo han quedado claros.

Los métodos tradicionales de recuento en placa dan una imagen de valoración cuantitativa como consecuencia del principio de igualdad que consideran; en ellos cada célula tiene la misma oportunidad de crecer y manifestarse fenotípicamente. Pero generalmente no se expresa el resultado de un análisis microbiológico de conteo con más de dos cifras significativas, porque el número de células presente en un alimento no puede ser conocida más que como una constante de proporcionalidad cercana. Un agregado de 20 células puede dar lugar al nacimiento de una colonia de las mismas características que una sola célula. Por ello, ya no se habla de colonias, sino de unidades formadoras de colonias (ufc), además en numerosos estudios, se ha mostrado que la tasa de recuperación es extremadamente variable y no por ello se subvalora la utilización de esas técnicas (Craven et al, 1994, Fernández et al, 1996).

Este mismo ejemplo también podría ser válido para las metodologías de trabajo desarrollado con el sistema *Diramic* si se sustituye la palabra células por diferenciales de turbidez, ya que un tipo de célula puede producir cambios turbidimétricos más rápidos que otras. En realidad existen variaciones en los resultados de estimación en los dos tipos de análisis microbiológico, los que detectan el número de unidades formadoras de colonia y los que detectan la señal turbidimétrica, ello explica la tendencia hacia resultados de análisis en formas cualitativas y semicualitativas, lo que según Vasavada, (1993) con algunas trabas por parte de microbiólogos que aún se mantienen apegado a los métodos y conceptos tradicionales.

La metodología desarrollada estima la calidad de la leche en función de los criterios siguientes: para la leche cruda partiendo de los cambios de turbidez, se definió el grado de contaminación por el delta que se produce en el tiempo predeterminado que fue de 8 horas y para la leche pasteurizada, un tiempo de preincubación en función de la sensibilidad buscada, de forma tal que se clasifica las mismas en dos categorías, en norma o fuera de norma (NC- 78-05-1988). En ninguno de los dos casos las lecturas son destructivas y puede dársele una continuidad a las muestras para una mayor interpretación. Estos elementos le permiten al sistema innumerables posibilidades de uso en el país ya que ayudaría a impulsar la modernización de los laboratorios lácteos y ello redundaría en una mayor calidad de la materia prima y el producto terminado. Las características del sistema se pueden resumir de la forma siguiente:

- Los resultados son obtenidos en un lapso de tiempo razonable.
- Es de fácil manipulación.
- Valores de precisión aceptables para ser la primera versión del equipo en el campo del diagnóstico bacteriológico de la leche cruda y pasteurizada.
- Se produce en el país y los costos están en el orden de diez veces menos que las tecnologías encontradas en el mercado internacional.

- Reduce el consumo de medios de cultivo en un 85-90 %. Haciendo una comparación en la cantidad de medio consumido por cada método tenemos que con un frasco de 500 g con el sistema *Diramic* se pueden trabajar 3600 muestras más que con el método de referencia de conteo total en placa y 1772 en el caso de coliformes, permitiendo un ahorro por muestra de 0.072 \$ y 0.129 \$ respectivamente.

## CAPITULO VI

### Conclusiones Generales

- El desarrollo de metodologías de trabajo específicas para el diagnóstico bacteriológico de la leche cruda y pasteurizada permite estimar el nivel de contaminación de las mismas en tiempos más cortos que el método de conteo en placa y con indicadores de calidad analítica similares a los establecidos internacionalmente.
- La aplicación de la metodología desarrollada posibilitó la clasificación de la leche cruda según niveles de contaminación, así como estimar de forma rápida la contaminación postpasteurización y la vida útil de la leche pasteurizada.
- Se definió un esquema para la realización de estudios colaborativos en el campo de la bacteriología de la leche, el cual fue comprobado de forma práctica en la validación del sistema *Diramic*.

### Recomendaciones.

- Utilizar el sistema *Diramic* en los laboratorios del sector lechero nacional para el conteo total de bacterias viables, como alternativa al conteo en placa y los métodos de reducción de colorantes. Ello permitirá modernizar los sistemas de pago y los programas de mejora de la calidad de la leche cruda.
- Emplear la metodología desarrollada en la industria láctea para detectar la contaminación postpasteurización y la vida útil de la leche pasteurizada así como para implementar esquemas de análisis de riesgos y puntos críticos de control.
- Establecer normas ramales y/o empresariales que permitan reconocer oficialmente la metodología de trabajo con el sistema *Diramic*.

- Desarrollar otros estudios de aplicación del sistema *Diramic* en la evaluación de la calidad de otros productos de origen animal incluyendo nuevas posibilidades en el sector lácteo.
- 
- Adams, M.R.; Hope, C.F.A. (1986). Fast food techniques. Laboratory Practice 35 (7) pp. 15'18.
- Alanis de la O, Luis Angélica.; Rosas Beatris,T., (1994). Microbiología de la leche. Conferencia del 1<sup>er</sup> Curso Taller de Higiene y tecnología de la leche. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. División Ciencia Veterinaria.
- Alcaraz Lucia,E.A.; Hasuoka,R.; Centorbi, Olga,N. (1996). Determinación de la calidad sanitaria de la leche en polvo reconstituida de dos hospitales de la ciudad de San Luis, Argentina. Tecnología Láctea Latinoamericana. N° 3 pp 34-38.
- Alcolado, A.; De Duero, A. (1989). Identificación y corrección de riesgos en leche líquida: HACCP, LISA. Organismos indicadores de fallos en proceso, organismos indicadores de calidad de conservación. Modernos Métodos Microbiológicos para Productos Lácteos. Complemento Español a la Publicación Especial N° 8901. Ponencia 1.3. Publicado por IDF.
- Andrews, W. H. (1987). Special Report. Recommendations for Preparing Test Samples for AOAC Collaborative Studies of Microbiological Procedures for Foods. J. Assoc. off Anal. Chem. vol. 70. N°. 6.
- Andrews, W.H. (1995). Foog microbiology Nondairy. Journal of AOAC International 78: 1, 182-188.
- Arkesteijn, G.J.M.W. (1987). A turbidimetric method for assessing the microbial content of food products, Postpresentation and Fifth

International Symposium on Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology. 4-6 nov. Florence. Francia.

- Auclair, J. (1986). Processes avoiding recontamination of pasteurised milk. In Monograph on pasteurised milk. Bull. Int. Dairy Fed. 200, 15-16.
- Badini, K.B.; Nader, Filho, A.; Amaral, L.A. (1996). Características microbiológicas comercializado clandestinamente nos municípios de botucatu e de Sao Manuel Estado de Sao Paulo, Brasil. . Abstracts XV Panvet. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias 21-28 de Octubre de 1996. Campo Grande .Ms. Brasil 470, p 203.
- Bae. I. H.; Seung. J. W. (1992). Study on effects of farm water quality on microbiological quality of raw milk. Korean Journal of Dairy Science. 14 (2). 139-147.
- Baird Parker, A.C. (1995). Development of industrial procedures to ensure the microbiological safety of food. Food Control 6: 1 29-36.
- Baker, J.M.; Griffiths, M.W. Colliin-Thompson, D.L. (1992). Bacterial bioluminescence applications in food microbiology. J. Food Prot. 55:62.
- Barcina, Y.; Mora, M.T.; Herrera, A. (1989). Métodos de detección rápida en microbiología de los alimentos. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 29 (2), pp149-161.
- Baumgart, J. (1996). Quick methods and automation in food microbiology. Fleischwirtschaft, Vol 76, Iss 2, pp 124.
- Beloti, L.G.G.; Beloti, V.; Freire, R.L.; Barros, M.A.; Souza, J.A.; Manduca, S.; Martins. (1996). Aspectos microbiológicos do leite pasteurizado tipo A consumido na cidade de Londrina. Abstracts XV Panvet. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias 21-28 de Octubre de 1996. Campo Grande . Ms. Brasil. 1410. p 200.

- Beloti, V.; Barros, M.A.F.; Nero, L.A.; Santana, E.H.; Teixeira, A.C.M. (1998<sub>1</sub>). Evaluación de la calidad de la leche cruda clandestina comercializada en la región norte del estado de Parana, Brasil. Memorias del Congreso Panamericano de Mastítis y Calidad de la Leche. Mexico 23-27 Marzo.
- Beloti, V.; Barros, M.A.F.; Nero, L.A.; Santana, E.H.; Teixeira, A.C.M. (1998<sub>2</sub>). Evaluación de la calidad microbiológica de las leches enviadas para pasteurización lenta y rápida en la región norte del estado de Paraná, Brasil. Memorias del Congreso Panamericano de Mastítis y Calidad de la Leche. México 23-27 Marzo.
- Beloti, V.; Franco, B.D.M.; Barros, M.A.F.; Nero, L.A.; Santana, E.H.; Teixeira, A.C. (1998<sub>3</sub>). Comparación entre los métodos Colisuretm y medio Bilis verde Brillante usando tubos múltiples para contar coliformes y *Escherichia coli* en leche pasteurizada. Memorias del Congreso Panamericano de Mastítis y Calidad de la Leche. México 23-27 Marzo.
- Beloti, V.; Franco, B.D.M.; Barros, M.A.F.; Nero, L.A.; Santana, E.H.; Teixeira, A.C. (1998<sub>3</sub>). Evaluación de la calidad microbiológica de leches pasteurizadas comercializadas en la ciudad de Londrina, Estado de Paraná, Brasil. Memorias del Congreso Panamericano de Mastítis y Calidad de la Leche. México 23-27 Marzo.
- Beloti, V.; Freire, R.L.; Barros, M.,A.; Nero, L.A.; Souza, J.A.. (1996<sub>2</sub>). Aspectos fisicoquimicos e microbiologicos dos leites pasteurizados tipos integral D esnatado consumido na cidane de Londrina. Abstracts XV Panvet. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias 21-28 de Octubre de 1996. Campo Grande .Ms. Brasil, 1412 p 200.
- Berg, C.; Dahms, S.; Hildebranddt, G.; Klaschka, S.; Weiss, H. (1994). Microbiological collaborative studies for quality control in food laboratories:Reference material and evaluation of analysts errors. International Journal of Food Microbiology 24:1-2 pp 45-52.

- Bertilsson, J.; Gyllensward, M.; Lingvall, P. (1996). Factors affecting the contamination of bulk milk with Clostridia spores. IDF Symposium. Bacteriological Quality of Raw Milk, pp 33-35. Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo, 1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Best, A.; Garcés, R.; López, J.; Briones, M.; Donny, A.. (1996). Evaluación de la calidad bacteriológica y citológica de leche a granel de lecherías de la VIII Región. Memorias del III<sup>er</sup> Taller Internacional sobre Calidad de la Leche. pp. 29-39. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. 9-11 oct. 1996.
- Betancourt, A. (1997). Buenas prácticas de laboratorios. Instrucciones para su aplicación en laboratorios de análisis de leche y sus derivados. Libro de Conferencias. Ediciones Internas. CENLAC/CENSA.
- Beumer, R.R.; Brinkman, E. (1989). Detection of Listeria spp with a monoclonal antibody based ELISA. Food Microbil. 6:171.
- Beumer, R.R.; Brinkman, E.; Rombouts, F.M. (1990). Enzyme-linked immunoassays for detection of Salmonella spp.: a comparison with other methods. Int.J.Food Microbiol. 12:363.
- Bernadette, F. (1996). Métodos Rápidos en microbiología de alimentos. Abstracts XV Panvet. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias 21-28 de Octubre de 1996. Campo Grande. Ms. Brasil. S1. p 27
- Bigalke, D. (1984). Methods used for monitoring the microbiological quality of raw milk. Recently proposed methods of raw milk microbiological evaluation. Dairy and Food Sanitation 4 (6) pp. 229-230.
- Bishop, J. R. (1989). The preliminary incubation count is it good enough. Dairy Food Env. Sant. 9: 122,

- Bishop, R.J. (1998). Extendiendo la vida de almacenaje de productos lácteos procesados. Memorias del Congreso Panamericano de Mastitis y Calidad de la Leche. México 23-27 Marzo.
- Bisop J.R. (1995). Food microbiology - Dairy. Journal of AOAC International 78: 1, 181-182.
- Blondeau, J.M; Contreras, O.R; Hernández, S; Sutor, M.E. (1997). Evaluation of the DIRAMIC Microbiology System. Abstracts, 97<sup>th</sup> General Meeting, Miami Beach, Florida, May 4-8, no.C-92, pp.136.
- Breed, R. S. (1911). The determination of the number of bacteria in milk by direct microscopic examination. Zenttralblatt För Bakteriologic, Parasitenunde, Infektionskranheiten and Higgiene, Part II (IglI), 30: 337-440,
- Brodsky, M.H.; Ceiben,B.W. (1980). Collaborative evaluation of the plate loop tecnique for determining viable bacterial counts in raw milk. Journal of Milk and Food Protection, 43, 287-291.
- Buchrieser,-C.; Kaspar,-C.W. (1993). An improved direct viable count for the enumeration of bacteria in milk: Int.-J.-Food-Microbiol. vol. 20, no. 4, pp. 227-236
- Busta, F.F.; Peterson, E. H.; Adams, A. M.; Johnson, M. G. (1992.). APHA. Chapter 4. Colony Count Methods. Compendium of Methodos for the Microbiological examination of foods. 2<sup>da</sup> Edic. Edit. Marsvinl/Spek, pp 45,
- Byrne, R.D.; Bishop, J.R.; Boling, J.W. (1989). Estimation of potential shelf life of pasteurized fluid milk utilizing a selective preliminary incubation. J. Food Prot. 52:805.
- Cabrera, A.; Alvarez, L. (1997). El precio de la leche en función de su calidad higienico sanitaria. Libro Resumenes. S-15, p 71. Jornada

Científico Metodológica por el 90 Aniversario de la Educación Veterinaria en Cuba.

- Carmody, Nelsa; Gortadi, Gabriela; Barbosa, Norma; Di Pietro, Silvana; Alvarez, Mabel; Edmundo, L. (1995). Aptitud para el consumo de la leche entera pasteurizada a partir de su fecha límite de expendio en la provincia de Río Negro, Argentina, Tecnología Láctea Latinoamericana. 2: 20-25.
- CEE, (1991). Enumeración de coliformes recuento de colonias a 30°C. Diario oficial de las comunidades europeas N° 1 93/29: 13.4.91.
- CEE, (1991). Legislación. Toma de muestra de leche cruda y tratada térmicamente. Diario Oficial de la Comunidad Económica Europea 13.4.91, No L93/6.
- CEE. (1992). Criterios para las propiedades cualitativas de la leche desde el punto de vista higiénico. Council Directive 92/461 CEE. Regulaciones CEE. No. 2377/90.
- Chan, S.W.; Wilson, S.G.; Garcia, M.V.; Whippie, K.; Ottoviani, M.; Whilby, A.; Shad, A.; Johnson, A.; Mozola, M.A; Halbert, D.N. (1990). Comparative studie of colorimetric DNA hibridation method and conventional cultture procedures for detection of salmonellae in food. J.Assoc. Offic. Anal. Chem. 73:419.
- Chang, L. (1998). La modelación microbiológica predictiva en la estimación de la durabilidad de los alimentos. VI Conferencia Internacional de Ciencia y tecnología de los Alimentos. 23-27 de Marzo. La Habana. Cuba.
- Charles, H.; Mc Kimmon, Rosemary Fulford, J. (1982). Effect of test washing on the bacteriological contamination of milk from cows kept under various housing conditions. J. of Dairy Research 50: 9 153-161.

- Clavijo, Luisa Maria. (1991). Efectos de las políticas gubernamentales sobre la calidad de la leche. Temas agropecuarios. Año 4 No 7.
- Contreras et al. (1995). Aspectos técnicos y prácticos del sistema Diramic. Revista CNIC vol.26 N°. Especial:85-87.
- Contreras, R., Rivero, J., Roura, G., Hernández, C., Pascual, A. (1993). Diramic a New System for really rapid determination of antibiograms and urinary tract infections. Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology. Londres.
- Cousins, Christina. M.; Bramley, A.J. (1981). The microbiology of Raw Milk. Dairy microbiology. Vol. 1 The Microbiology of milk. Ed. R.K. Robinson. Essex, England, Elsevier. Applied Science Pub, pp.120-135.
- Craven, H.M.; Forsyth, S.R.; Drew, P.G.; Macauley, B.J. (1994). A new technique for early detection of Gram-negative bacteria in milk. AUST. J. Dairy Technol. vol. 49, no. 1, pp. 54-56.
- Curiale, M.S.; Klatt, M.J.; Mazola, M.A. (1990). Colorimetric deoxyribonucleic acid hybridization assay for rapid screening of salmonella in food. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 73:248.
- Curiale, M.S.; Klatt, M.J.; Robinson, B.J.; Beck, L.T. (1990). Comparison of colorimetric monoclonal enzyme immunoassay screening method for detection of Salmonella and foods. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 72:43.
- Curiale, M.S.; Gangar, V.; D'onorio, A.; Gambrel, Lenarz, S.; McAllister, J.S. (1997). High-sensitivity dry rehydratable film method for enumeration of coliforms in dairy products: collaborative study. J-AOAC-Int. May-Jun; - 1997 80 (3): 505-16

- D’Ombrain, L.; Toyne, S.; Vasavada, P. C.; Hull, R. R. (1990). Impedance measurement to determine activity and bacteriophage of lactic starter culture. In Brief communications with the XXIII International Dairy Congress, Montreal, Vol II,.
- Dainty, H.; Edwards, R.A. (1991). Rapid Methods of Microbial Determination and Enumeration for the Meat Industry. Rapid Methods in Microbiology and Immunology. Eds. Vaheri, A. Tilton, R. C. Balows, A.: pp 533-540.
- Dassen, A.; Olid, R.M.; Piton, C.; Grappin, R. (1992). Assessment of the Bactoscan for rapid and automatic enumeration of total flora in raw milk. Lait, 71 (6): 661-670.
- Datta, A.R.; Wentz, B.A.; Shook, D.; Truckess, M.W. (1988). Synthetic oligonucleotide probes for detection of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 54:2933.
- De Jon, W. (1994). Pago de la leche por calidad. V Congreso panamericano de la leche. Feria
- Djuretic, T.; Wall, P.G.; Nichols, G. (1997). General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992 to 1996. Commun-Dis-Rep-CDR-Rev. 1997 Mar 7; 7(3):41
- Dommett, T. W.; Kwee, W. S.; Vos, A. C. (1994). Estimation of residual shelf life of pasteurized milk using the PCA-ANS method. The Australian Journal of Dairy Technology. (49): 48-53,
- Dommett, T.W. (1992). Spoilage of aseptically packaged pasteurised liquid dairy products by thermophilic psychrotrophs.: Food-Aust. vol. 44, no. 10, pp. 459-461.

- Dziezak, J.D. (1987). Rapid methods for microbiological analysis of food. Food technol. 41, pp.56-73.
- Easter, M. C. (1989). Metabolic activity as a measure of microbiological evaluation. Modern Microbiological Methods for Dairy Products. Proceeding of International Seminary in Stander Spain. 202-229,
- Easter, M.C.; Gibson, D.M. (1985). Rapid and automated detection of Salmonella by electrical measurement. J. Hyg. 94:245.
- Eley. A. (1990). New rapid detection methods for Salmonella and Listeria. Br. Food J. 92:28.
- Exposito, J.A. (1998). Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la acidez titulable de tres marcas de leche pasteurizada consumidas en Barquisimetro. Venezuela. p 198. Memorias del Congreso Panamericano de Mastitis y Calidad de la Leche. México 23-27 Marzo.
- FAO. (1981). Composición y propiedades de la leche. Equipo Regional de Desarrollo y Capacitación en Lecherías de FAO para América Latina. Feb,
- FAO-OMS. (1996). Comisión de Codex Alimentario. Anteproyecto de código relativo a las prácticas higiénicas para la elaboración de quesos maduros, no madurados y blandos madurados. Alinorma 95/13, Apendice V Roma. Mayo 1996.
- Fernandez, Astorga-A.; Hijarrubia, MJ.; Lazaro-B; Barcina, L. (1996). Effect of the pre-treatments for milk samples filtration on direct viable cell counts. J-Appl-Bacteriol. May; 80(5): 511-6
- Figueredo, F. (1996). Panorama general de la producción de leche y exigencias sobre calidad en Paraguay. Congreso Nacional de Calidad de

la leche y mastítis. Memorias pp 60-66. Rio Cuarto. Argentina, 7-9 nov. 1996.

- FIL. (1991). Milk and Milk products enumeration of microorganisms colony count technique at 30°C. International IDF Standard 100B:.
- FIL. (1991). Milk and Milk products precision characteristics of analytical methods oline of collaborative study procedure. International IDF Standard 135B: 1991.
- FIL. 122B:1992. Milk and milk products. Preperation of samples and dilutions for microbiological examination.
- Firstenverg-Eden, R.(1984). Colaborative study of the impedance method for examining raw milk samples. J.of Food Prot. 47, 9. 707-712.
- Firstenverg-Eden, R.; Van Sise, M.L.; y Khan, P. (1984). Impedimetric Estimation of coliforms in Dairy Products. J.of Food Sciece (49).6: 1449-1552.
- Fitts, R. (1985). Development of DNA hibridization test for the presence of Salmonella ind foods. Food Technol. 39 (3): 94.
- Flower, R.S. (1998). Interés de Salud Pública relacionada a los microorganismos en la leche y productos lácteos. Memorias del Congreso Panamericano de Mastítis y Calidad de la Leche. México 23-27 Marzo.
- Flower, R.S., and Klatt,M.J. (1989). Immunodiffution screening method for detection of motile Salmonella in foods. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 72:303.

- Fuhrmann, T.J., (1998). Producción de leche de alta calidad. Memorias del Congreso Panamericano de Mastítis y Calidad de la Leche. México 23-27 Marzo.
- Fung, D.Y.C (1992). Historical development of rapid methods and automation in microbiology. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 1:1-14.
- Fung, D.Y.C. (1994). Rapid methods and automation in food microbiology: A review. *Food Reviews International* 10: 3, 357-375.
- Gäida - Rongvaux, D.; Reroz, A.; Verdier, B.; Piton, C. (1989). Estimation de la flore du lait cru par microrespirometrie a pression et volume variables. *Lait*. Accepte pour Publication,
- Gatti, M.; Neviani, -E. (1993). A new simple medium for the detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* by measurement of conductance changes: *Lett.-Appl.-Microbiol.* vol. 17, no. 2, pp. 72-74
- Gesche Erika, (1989). Otro método de recuento de bacterias viables. *Boletín FIL*, 177-1989.
- Giffel, M.,C.; Beumer, R.R.; Slaghuis, B.A.; Rombouts, F.M. (1996). Occurrence and characterization of (Psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. *IDF Symposium. Bacteriological Quality of Raw Milk*, pp 40-45. Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo,1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Giraudó, J.; Rampone, A.; Rampone, H.; Frigeiro Cecilia.; Calzolario, A. (1996). Programa de mejoramiento de la calidad de la leche y mastítis en una cooperativa del Sur de Córdoba. *Congreso Nacional de Calidad*

de la leche y mastítis Memorias pp 102-103 Rio Cuarto. Argentina. 7-9 nov. 1996.

- Gnau, S.; Luedecke, L. O. (1982). Impedance measurements y in Raw Milk as an alternative to the Standard Plate count. *Journal of food Protection*.1 (45): 4-7.
- Goldschmidt, M.C. (1991). Microbiological Instrumentation for the Food Industry: A Review. *Rapid Methods in Microbiology and Immunology*. Eds. Vaheiri, A. Tilton, R. C. Balows, A.: pp 512-519.
- Gonzalez, R. (1996). El programa de control de mastítis del estado de New York. Estados Unidos de América. Congreso Nacional de Calidad de la leche y mastítis Memorias pp 9 11.Rio Cuarto. Argentina. 7-9 nov. 1996.
- Gonzalez, R.; Hernández, J.E.; Leiva Virginia.; Cisnero, E.; Luis Lisset, Lara C.; Pérez Olga. (1998). Aplicación de un sistema de diagnóstico rápido microbiológico (DIRAMIC) para valorar la calidad higiénico sanitaria de la leche cruda. Estudio preliminar. VI Conferencia Internacional de Ciencia y tecnología de los Alimentos. 23-27 de Marzo. La Habana. Cuba.
- Gooding, C.M.; Choudary, P.V. (1997). Rapid and sensitive immunomagnetic separation-polymerase chain reaction method for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk and ice-cream.*J-Dairy-Res*. 1997 Feb; 64(1): 87-93
- Grappin, R.; Piton, C.; Dassen, A. (1989). Indirect enumeration of total flora in raw milk using bacterial activity criterial. *Modern Microbiological Methods for Dairy Products*. Proceedings of International seminar in Santander, Spain paper. 220-247.

- Greubel, S. (1997). Health risks due to unpasteurized milk?. Med-Monatsschr-Pharm. 1997 Jan; 20(1): 20-25.
- Griffiths, M.W., (1992). Application for bioluminescence in dairy microbiology. J.Dairy Sci.76.
- Grover, S.; Batish,-V.K.; Tatini, S.R. (1993). Emerging pathogens of concern to dairy industry and their rapid detection: Indian-Dairy Man. vol. 45, no. 8, pp. 343-348
- Hadlang, G. (1966). Oxygen Measurements as a basis for classification of milk. Proceedings XVIII, International Dairy Congress. B.: p 233-237.
- Hahn, G. (1996). Pathogenic bacteria in raw milk-Situation and significance. IDF Symposium. Bacteriological Quality of Raw Milk, pp 67-83. Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo, 1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Haynes, J.L. (1988). Principles of flow cytometry. Cytometry (suppl) 3: 7-17.
- Heeschen. W. H.; Suhren, G.; Hanh, G. (1991). Rapid methods in the Dairy Industry. Vaheri A. Tilfon RC Bolows A Eds.:520-532.
- Helinen, K. (1989). Test results for farms milk in 1988 and challenges to quality in Europe. Suomen Elainlaakarilehti 95 (6), pp 304'307.
- Hernández, J. E.; Gersey Maria, Contreras, R.; Ponce, P., Rivero, J., Rodriguez, F. (1993). Evaluación de un equipo Conductimétrico (DIRAMIC) para el análisis bacteriológico de la leche cruda. Libro de procedimiento II Taller Internacional sobre calidad de la leche. 105-113. México.

- Hernández, J. E.; Contreras, R.; Ponce, P.; Mabelin Armenteros; Rodríguez, F. (1995). Evaluación de un equipo turbidimétrico (*DIRAMIC-03*) en la estimación del conteo total de bacterias en muestra de leche cruda. *Tecnología Láctea Latinoamericana* N° 2.
- Hernández, J. E.; Nuria Dávila; Ramírez, I.; Ponce, P.; Contreras, R. (1996). Monitoreo de cepas contaminantes de leche pasteurizada. Libro Resumen. II Encuentro Iberoamericano de Farmacia y Ciencia de los Alimentos. La Habana.
- Hernández, J.E; Dávila, N; Ramírez, I; Ponce, P y Contreras, R (1998): Utilización del sistema DIRAMIC en la detección de contaminación post-pasteurización en leche pasteurizada. Memorias del Congreso Panamericano de Mastítis y Calidad de la Leche. México 23-27 Marzo.
- Hesschen, W. (1996). Situation in the EU and IDF-member countries IDF Symposium. Bacteriological Quality of Raw Milk, pp 1-18. Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo, 1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Hesschen, W.; Hammer, H. (1998). Bacterias esporuladas termorresistentes en productos lácteos. Identificación y patogenicidad. Memorias del Congreso Panamericano de Mastítis y Calidad de la Leche. México 23-27 Marzo.
- Hill, B.M. (1991). Direct microscopic count method. *Bulletin of the IDF* 256/1991: 17-19.
- Hunter, A.; Mc Corcuodale. R.; Nona, M. (1983). Evaluation of DEFT for assessing the higienic condition of milking equipement. *J. of Dairy Research* 50: 9 9-16.
- Ibarra. A. (1996). Calidad de la Leche Cruda y Sistema de Pago. Memorias del III<sup>er</sup> Taller Internacional sobre Calidad de la Leche. pp. 29-39. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.

- IDF (1991). Métodos de rutina para evaluar la calidad bacteriológica de la leche cruda. Bulletin 256/1991.
- IDF (1995). IDF (1995). Milk payment systems for exfarm milk. Antibiotics testing. Mastitis Control. Bulletin No 305/1995.
- In't-Veld,-P.H.; Notermans, S. (1992). Use of reference materials (spray-dried milk artificially contaminated with Salmonella typhimurium ) to validate detection methods for Salmonella.: J.-Food-Prot.. vol. 55, no. 11, pp. 855-858
- In't-Veld, P.H; Van, Strijp, Lockefeer, N.G.; Havelaar, A.H.; Maier, E.A. (1996). The certification of a reference material for the evaluation of the ISO method for the detection of Salmonella. J-Appl-Bacteriol. May; 80(5): 496-504.
- ISO - 5725:1994 Part.3,6. Precision of test Methods. Determination of repetibility and reproducibility for standar test method by inter-laboratory test.
- ISO - 5725-1 (1994). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results Part 1. General principles and definitions.
- ISO – 8261 (1989). International Standard. Milk and milk products. Proportion of test samples and dilution for microbiological examination.
- ISO - 11866-1:(1997). E. Milk and milk products.Enumeration of presuntive ***Escherichia coli***. Part 1. Most probable number technique.
- ISO- 3534-2: (1993). Statistics-Vocabulary and Symbols-Part 2: Statistical quality Control.

- Jackson, B. Chen Wu, J.; Hansen, T.; ,Levine, J.; Ho,Y. (1992). Quantitative Listeria testing for food within 24 h without enrichment. Page 103 in Adstr.1992 IFT Annu. Mtg, New Orleans, LA. Inst. Food Technol., Chicago. IL (Abstr.).
- Jakob, R. (1989). Automated turbidimetry for the rapid differentiation and enumeration of bacteria in food. International Journal of Food Research and Technology, vol.189, (2), 147-148.
- Jarvis, B. (1982). Rapid methods in food microbiology: a practical approach. Food Technol. Aust. 34:11 pp 149.
- Jay, J. M. (1992). Low -Temperature food preservation an characteristics of psicrotrophic microoganisms. In modern Food Microbiology 5<sup>th</sup> London Chapman and Hall, 328.
- Jenson, I. (1991). Enumeration of microorganisms in foods. Food Aust. (43): 450. June, G.A.; Sherrod, P.A.; Andrews, W.E. (1992). Comparison of two enzyme immunoenssays for recovery of Salmonella spp from four low moisture foods. J. Food Prot.51:53.
- Kramer, J.; Holzapfel, W. (1994) 15th International Symposium of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene. Trends in Food Science and Technology 5: 6 199-200.
- Kroll, R.G. (1989). Filtration techniques and rapid microbiological methods for dairy products. Brussels, Belgium IDF. 173-183.
- Kroll, R.G. (1989).The citocromo e oxidasa test to assess psichrotrophic bacteria in milk. In modern microbiological method for dairy products, Brussels, Belgium, IDF. 272-276.

- Lahellec, C. (1991). Rapid Methods in the Poultry Industry. Rapid Methods in Microbiology and Immunology. Eds. Vaheiri, A. Tilton, R. C. Balows, A: pp 543-548.
- Langford, S.A.; Kroll, R.G. (1992). Comparison between the EC plate count test at 21 degree C and an accelerated plate count method for assessing the keeping quality of pasteurized milk. J.-Dairy-Res. vol. 59, no. 3, pp. 431-436.
- Larsen, H.D.; Jorgensen, K.. (1997). The occurrence of Bacillus cereus in Danish pasteurized milk. Int-J-Food-Microbiol. Feb; 34 (2): 179-186.
- Leiva, Virginia.; Villoch, Alejandra. (1991). Comunicación personal.
- Lück, H. (1991). Dye reduction tests. Bulletin of the IDF 256/1991:31-34
- Lück, H.; Clark, P.C.; Groeneveld, H.T. (1970). The suitability of dye reduction test for estimating the bacteriological quality of bulk coaled milk. Agroanimalia. 2: 69-76.
- Lück, H., Lategan, B. (1985). Calibration of Loops used for the plate Loop technique. South African Journal of Dairy Technology. 17:83-85.
- Lück, H.; du Toit, J.J.; Hermann, M.N. (1968). The oxygen content of milk as an index of its bacterial count. South- African Journal of Agriculture Science. 11: 141-152.

- Lunder, T.; Brenne, E. (1996<sub>1</sub>). Factors in the farm production affecting bacterial content in raw milk. IDF Symposium. Bacteriological Quality of Raw Milk, pp 103-107. Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo, 1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Lunder, T.; Brenne, E. (1996<sub>2</sub>). Seasonal, annual and animal impact on variation in relationship between bactoscan count and colony forming units. IDF Symposium. Bacteriological Quality of Raw Milk, pp 141-145 18. Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo, 1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Maddens, R.H.; Gilmour, A. (1995). Impedance as an alternative to MPN enumeration of coliforms in pasteurized milks. Lett.-Appl.-Microbiol. vol. 21, no. 6, pp. 387-388.
- Mahieu, F.M.H. (1991). Leche y productos lácteos. Cap. 4. Modificación de la leche después de su recogida pp:181-210 Cap.6. Recogida de la leche. pp:255-263. Edit. Acrivia. España.
- Manners, J.G. (1985). Trends in microbiological testing of milk and dairy products. Australian Journal of Technology 40 (2), pp. 73-75.
- Manners, J.G. Black, R.G., Craven, H.M. (1984). Interlaboratory test comparison program-Victoria. The Australian Journal of Dairy Technology. pp 167-170.
- Manninen, M., Wirtanen, G., Ahvenainen, R.; Mattila, T. (1990). Automated turbidometry in assessing the bacterial content of food products inoculated with pathogens. Food Science and Technology. International Journal for Food Chemistry. Biochemistry. Microbiology. Technology and Engineering. 1990, vol. 23, (1). pp 20-24.
- Mardones, F. R. (1994). Importancia de la leche y los productos lácteos en la salud nutricional humana. Libro Resumen: Memoria: VI Congreso Panamericano de Lechería. Medellín-Colombia.

- Martínez, Del P. Elsa.; Ponce, P.; Ginorio, Caridad.; López, M<sup>ra</sup> Gersy.; Morales, Caridad. (1992). Control de la Calidad Higiénica de la Leche: Una condición necesaria desde la vaca al consumidor. Memorias del I Encuentro Taller sobre Control de la Calidad de la Leche y Derivados Lácteos. 5<sup>to</sup> Aniversario del CENLAC/CENSA pp 184-207. La Habana.
- Martínez, A.; Rodrigo R. (1987). Métodos rápidos en el análisis microbiológico de alimentos. Rev. Agroquimi. Tecnología Alimen. 1 (27). 15-25.
- Martínez. J.; Carrasco, A.; Fernández, H.; Cabrera, A.; Lamazares, J. (1993). Factores que influyen sobre la calidad higiénica sanitaria de la leche en el momento de su obtención. Memorias del II Encuentro Taller sobre Control de la Calidad de la Leche y Derivados Lácteos. pp 120-127. Univ. Autónoma Metropolitana Xochimilco. México.
- Mattila, T.; Alivehmas, T. (1987). Automated turbidometry for predicting units in raw milk. International Journal of Food Microbiology, vol. 4, (2), pp 157-160.
- Mattila, T. (1987). Automated turbidometry-a method for enumeration of bacteria in food samples, Journal of food protection. vol. 50, (8), pp 640-642.
- Mc Clure, P.J.; Cole, M.B.; Davies, K.W.; Anderson, W.A. (1993). The use of autmated turbidimetric data for the construction of kinetic models, Journal of Industrial Microbiology, vol.12, pp.277-285.
- Mc Guiggan, J.T.M.; Gilmour, A.; Lawrence L..M. (1994). Factors influencing the recovery of psychrotrophic mesophilic and thermophilic Bacillus spp from bulk raw milk. Journal of the Society of Dairy Technology 47: 4, 111-116.
- McKellar, R.C.; Modler, H.W.; Couture, H.; Hughes, A.; Mayers, P.; Gleeson, T.; Ross, W.H. (1994). Predictive Modeling of Alkaline

Phosphatase inactivation in High-Temperature Short-Time Pasteurizer. Journal of Food Protection 57: 5 424-430.

- Mc Meekin, T.A.; Ross, T. (1996). Modeling Applications. Journal of Food Protection. Supplement, 37-42.
- Meireles, A. J. (1996). A des Razão Lacticinista, a Industria de laticivios no ultimos, Quartel do seculo XX. Ed. Meireles, A.J.. Edit. Cultura Editores Associados, Brasil, Cap. 11, pp 209-225.
- Meyer, M.; Salinas, K. (1988). Manual para la Educación Agropecuaria, Elaboración de Productos Lácteos. Primera Ed. Edit. Trillas. S.A. de C.V, México, pp 5-6.
- Moody, T.P.; Donovan, M.A; Laue, T.M. (1996). Turbidimetric studies of Limulus coagulin gel formation. Biophys, J. 71 (4).
- Moran, L.; Rowe, M.T; Gilmour, A. (1991). Evaluation of a direct epifluorescent filter technique (DEFT) for the enumeration of bacterial spores in raw milk. International Dairy Journal. 4 (1): 253-261.
- Moseley, W. (1975). Improving and maintaining shelf-life of dairy products. Dairy and Ice Cream Field. 158 (2):44-46, 94.
- Mottar, J.A. (1987). Colorimetric endotoxine assay for the determination of the bacteriological quality of milk. Netherland Milk and Dairy Journal. 41: 137-145.
- Muir, D.D. (1996<sub>1</sub>). The ShelfLife of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. Journal of the Society Dairy Technology. 1 (49): 24-30

- Muir, D.D. (1996<sub>2</sub>). The ShelfLife of dairy products: 2. Raw milk and fresh products. Journal of the Society Dairy Technology. 1 (49): 44-48.
- Muir, D.D. (1996<sub>3</sub>). The ShelfLife of dairy products: 3. Factors influencing intermediate and long life dairy products. Journal of the Society Dairy Technology. 1 (49): 67-72.
- Murphy, S.C.; Boor, K.J. (1998). Análisis de bacterias en leche cruda y cuentas elevadas de bacterias en la granja:Un resumen. Memorias del Congreso Panamericano de Mastítis y Calidad de la Leche. Mexico 23-27 Marzo.
- Murray, B. R. et al (1994). Manual of Clinical Microbiology. 6<sup>ta</sup> Edic. Ed. ASM. Press Washington. D.C. Cap. 11. 110-122.
- Nader Filho, A.; Amaral, L.; Rossi, Junior, O.D.; Schocken, Iturrino, R.P.; (1996). Características microbiológicas do leite Pasteurizado dos tipos B, e C Processados por algumas usinas de beneficiamento do estado de Sao Paulo. Abstracts XV Panvet. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias 21-28 de Octubre de 1996. Campo Grande .Ms. Brasil. 468 p.203.
- NC-38-02-07 (1997). Sistemas de Normas Sanitarias de Alimentos Contaminaciones Microbiológicos. Regulaciones sanitarias.
- NC-78-05. (1988). "Leche pasteurizada. Especificaciones de calidad.
- NC-78-11-01. (1983). Determinación de la acidez.

- NC-78-11-03. (1983). Determinación del índice de pH de la leche.
- NC-78-11-08. (1982). Análisis del Tiempo de reducción del Azul de metileno (TRAM). NRAG 1008, 1988.
- NC.78-25. (1986). Leche y sus Derivados LECHE.Toma de Muestra. pp1-5.
- Neder, F.A.; Amaral, L..A.; Schocken, Iturino, R.P.; Schoken, D.B.L. (1998). Características microbiológicas de la leche Tipo A cruda y pasteurizada en diferentes puntos del sistema de procesamiento. Memorias del Congreso Panamericano de Mastítis y Calidad de la Leche. Mexico 23-27 Marzo.
- Nieuwenhof, F.F.J.; Hoolwerf, J.D. (1986). Detection of post-paspasteurization of pasteurized milk with the Bioscreen. Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek, NIZO-EDE.Report Sep-1195, 7pp.
- Nieuwenhof, F.F.J.; Hoolwerf, J.D. (1987<sub>1</sub>). Impedance measurement as an alternative to Plate Count Method for Estimation the Total Count of Bacteria in Raw Milk. J. of Food Prot. vol.50 No 8, pp.665-668.
- Nieuwenhof, F.F.J. and Hoolwerf, J.D. (1987<sub>2</sub>). Impedimetric Detection of post-paspasteurization contamination in pasteurized milk. Nhet. Milk Dairy J. 41. 49-68
- Niuwenhof, F. (1996). Raw milk, hygiene management and ATP-bioluminescence. . IDF Symposium. Bacteriological Quqlity of Raw Milk, pp 113-118.Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo, 1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Notermans, S.; Veld, P.I. (1994). Microbiological challenge testing for ensuring safety of food products. International Journal of Food Microbiology 24: 1-2, 33-39.

- O'Connor, F. (1983). Rapid test methods for assessing microbiological quality of milk. *Australian Journal of Dairy Technology* 39 (2).pp. 61-65.
- O'Connor, F.; O'Riordan, C. (1991). Uso de Bactoscan 8000 in quality grading of suppliers milks. *Scandinavian. Dairy Information*. 3 (5): 57-60.
- O'Toole, D.K. (1983). Methods for the direct and indirect assessment of the bacteriological content of milk. *Journal of Applied Bacteriology*. 55: 187-201.
- O'Crave, H. M.; Macauley, B. J. (1992). Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. 1. Identification of types. *Australian Journal of Dairy Technology*. 1 (47): 38-45.
- Ongvaux-Gaida, D.; Piton, M.C. (1991). Application of turbidimetric version of limulus test to the evaluation of the gram negative flora in raw milk. *Lait* (71) 5:565-574.
- OPS, (1994). Las condiciones de salud en las Américas. Publicación Científica No 459. Vol. 1 pp. 262-265.
- Panreac, (1995). Medios de cultivos para Microbiología. Manual Básico. 1a Edición. Panreac Química, S.A.
- Patel, P. D. (1993). Overview of modern techniques in food microbiology. *Rapid methods and automation in microbiology and immunology*. Londres.
- Patel, D.A.; Siva, C.V.; Sannabhadti, S.S. (1993). Sources of microbial contamination of raw milk: *Indian-J.-Dairy-Sci.* vol. 46, no. 2, pp. 67-70

- Pêsic, D.; Dokic, G.; Stojanovic, L. (1991). Effects of raw milk microflora on the quality of pasteurized milk. Veterinarski Glasnik. 9 (45): 667-671.
- Phillips, J.; Griffiths, D.; Muir, D.D. (1983). Accelerated detection of post-heat treatment contamination in pasteurized double cream. J. Soc. Dairy Technol. 36:41-43.
- Philpot, N. (1996). La calidad de la leche y control de la mastitis. Disertación pronunciada en la 1<sup>era</sup> Exposición e Industria Lechera: Mondo Lácteo Clucella, Santa Fé, Argentina.
- Piton, C.; Gaida-Rongvaux, D. (1990). Estimation par conductimetric de la flore aerobe mesophile, des bacteries coliformes et de la flore psychrotrophe du lait cru. Lait 70: 293-306.
- Piton, C.; Grappin, R. (1991). A model for Statistical evaluation of precision parametrs of microbiological methods: Application to dray rehidratable film methods and IDF reference methods for enumeration of total aerobic mesophilic flora and coliformes in raw milk. J. Assoc. of Anal. Chem. 74 (1).
- Piton, C.; Dassen, A. (1988). Evaluaction de la mesure d'impedance comme technique rapide de appreciation de la qualite bacteriologique du lait cru. Lait. 68, 467-484.
- Plaksanguansri, C. (1991). Change in microbial count of pasteurized milk stored for varius times. Journal Natural Sciences. 1 (25): 54-64.
- Ponce P.; Capdevila, J. (1997). Caracterización del SILA. Un enfoque de sus posibles causas y de su corrección. Rev. Salud Animal Vol (en prensa).
- Ponce, P. (1998). Producción y calidad de la leche: aspectos técnicos y prácticos para técnicos y productores del Trópico Americano. Monografía CENLAC/CENSA. La Habana. Sept/98.

- Raciti, J.; Vagliante, F. (1996). Programa de trabajo orientada a mejorar la calidad higiénico sanitaria de la leche producido en tambos pertenecientes al departamento San Justo (Peia de Cordoba). Congreso Nacional de Calidad de la leche y mastítis Memorias pp 105-106 Rio Cuarto. Argentina. 7-9 nov. 1996.
- Ramirez, A.A. (1994). Fisiología de la lactación. Conferencia del 1er Curso Taller de Higiene y tecnología de la leche. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y agropecuarias. División Ciencia Veterinaria.
- Rampone, A.O.J.; Giraudo, J.A. (1996). Como producir leche de calidad para exportar. Congreso Nacional de Calidad de la leche y mastítis Memorias pp 123-136. Rio Cuarto. Argentina. 7-9 nov. 1996.
- Ravanis, S.; Lewis, M.J. (1995). Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. Letters in Applied Microbiology 20: 3, 164-167.
- Reichmuth, J.; Suhren, G.; Heeschen, W. (1996). Evaluation of routine methods for assessing the bacteriological quality of ex-farm milk.
- The IDF approach. IDF Symposium. Bacteriological Quality of Raw Milk, pp.119-130. Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo, 1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Reinheimer, J. A. (1996). Bacterias psicrotrofas. Su incidencia en la calidad de la leche y los productos lácteos. Memorias del Congreso Nacional de Calidad de la Leche y Mastítis. p 8. Rio Cuarto. Argentina.
- Reichmuth, J.; Suhren, G.; Heeschen, W. (1996). Evaluation of routine methods for assessing the bacteriological quality of ex-farm milk.

- The IDF approach. IDF Symposium. Bacteriological Quality of Raw Milk, pp.119-130. Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo, 1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Ren, Tyh-Jenq.; Frank, J.F. (1992). A survey of four fluid milk processing plants for airborne contamination using various sampling methods.: J.-Food-Prot. vol. 55, no. 1, pp. 38-42
- Reybroeck, W. (1996). Modern methods for bacteriological quality control of raw milk. IDF Symposium. Bacteriological Quality of Raw Milk, pp 131-140. Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo, 1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Richardson, G.,H.(1995). Enumeration of total bacteria in raw milk and pasteurized milk by reflectancia colorimetry :Collaborative study. Journal of AOAC International Vol.77, pp 623.
- Rodríguez Otero, J.L.; Hermida, M.; Taboada, C.; del Caño, S. (1991). Study of the Bactoscan 8000 and its. Comparison with the agar plate count method. Alimentaria. 220: 33-38.
- Rongvanx-Gäida, D.; Peroz, A.; Verdier, B.; Piton, C. (1990). Estimation of the bacteriological quality of raw milk using microrespirometric lait (Lyon). 1 (70): 23-36.
- Rongvanx-Gäida, D.; Piton, C. (1991). Comparison of the three methods of measurement of ATP content by bioluminescence to assess the bacteriological quality raw milk. Lait (Lyon). INRA. 4 (71): 483-491.
- Ruvalcaba, Silvia, B. (1994). Bioquímica de la leche. Conferencia del 1er Curso Taller de Higiene y tecnología de la leche. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y agropecuarias. División Ciencia Veterinaria.

- Ryser, L.. (1998). Microorganismos de importancia en leche cruda. Memorias del Congreso Panamericano de Mastítis y Calidad de la Leche. Mexico 23-27 Marzo.
- Santos, M.A. (1987). Leche y sus derivados. Editorial Trillas. S.A. Cap. 3, pp 103-130.
- Santos, A.; Campos, A.P.G.; Arita, G.M.M.; Zaroni, M.M.H.; Deak, J.G. (1996). Evaluation of the results of bacteriological examination of milk and derivatives carried out in animal reference laboratory (LARA), during 1995. Abstracts XV Panvet. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias 21-28 de Octubre de 1996. Campo Grande .Ms. Brasil. 434 p.213.
- Saubidet, M.D. (1996). Variación en la calidad de bacterias totales en leche. Congreso Nacional de Calidad de la leche y mastítis Memorias pp 26.Rio Cuarto. Argentina. 7-9 nov. 1996.
- Sebel, F.; Jilek, R.; Klienik, V. (1991). Possibilities of using a modified reductase test (Latest) for evaluation of hygienic conditions of primary milk production. Zivocisná Vyroba. 36 (4):353-360.
- Serra, D.M.; Escobar, F.M. (1989). Utilización del automicrobic system en la determinación de la concentración bacteriana en productos lácteos.
- Proceedin of International Seminar. Modern micobiological methods for Dairy products. España. 248-253.
- Serufo, J.C.; Barbosa, A.; Goncalves, S.; Guimaraes, O.; Uehara, I.; Valle, LR; De Campos, H.G.; Diorio, V.J.; Contreras, R.; Pascual, A. (1995).

- Diagnóstico Rápido da Infecção do Trato Urinário. Estudo Comparativo com o Método Convencional. *Journal Brasileiro de Microbiologia* vol. 69, no.2 Agosto pp. 155-164.
- Silly, P.; Forsythe, S. (1996). Impedance microbiology--a rapid change for microbiologists. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 233-243.
- Siva, C.V.; Patel, D.A.; Sannabhadti, S.S. (1993). Microbiological status of raw and pasteurized milk: *Indian-J.-Dairy-Sci.* vol. 46, no. 2, pp. 62-66
- Siva, C.V.; Sannabhadti, S.S. (1994). Dung and milk cans as sources of aerobic and anaerobic bacterial spore contamination of raw milk: *Indian-J.-Dairy-Sci.* vol. 47, no. 5, pp. 401-405
- Sjobring, U.; Mecklenburg, M., Andersen, A.B. and Miorner, H. (1990). Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 28 (10): 2200.
- Slaghuis, B.A. (1996). Sources and significance of contaminants on different levels of raw mil production. Symposium. *Bacteriological Quality of Raw Milk*, pp 19-27. Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo, 1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Soler, A.; Ponsell, C.; De Paz, M. (1995). Nunez,-M.: The microbiological quality of milk produced in the Balearic islands: *Int.-Dairy-J.* vol. 5, no. 1, pp. 69-74
- Solodovnikov-IuP; Lytkina-IN; Pisareva-VA; Dron'-GI; Skachkova-VG. (1996). A milk-borne outbreak of salmonellosis in Moscow. *Zh-Mikrobiol-Epidemiol-Immunobiol.* 1996 Nov-Dec(6): 117-8.

- Speranza, J.; Demaria, R.; Paez, R.; Gallino, R. (1996). Efecto del uso de conservante en muestra de leche para la determinación de recuento total de microorganismos aeróbicos mesófilos en placa. Congreso Nacional de Calidad de la leche y mastítis Memorias pp 64. Rio Cuarto. Argentina. 7-9 nov. 1996.
- Spolaor, D.; Santo, M. L.; Zilio, F.; Zanatta, P.; Adam, C.; Holy, C.; Martignene, G.; Vola, G. (1989). Application of impedimetry in analysis of dairy products Quadernidell Instituto Lattiero-Caseario e de Biotecnologic Agroalimentary, Thiene, Italy.
- Stainer, R.; Adelberg, E.A.; Ingraham, J.L. (1984). Microbiología. Capítulo 9. Crecimiento Microbiano. 4ª Edición. Editorial Reverté, S.A. pp 263-278.
- Starker, R. M. (1984). Bioluminiscent ATP analysis for the rapid enumeration of principle bacterias, practice, potential areas of inaccuracy and prospects for the food industry. Campden Food-Preserv. Res. Assoc. Tech Bull. 57.
- Stauffer, J.E. (1993). Quality assurance and dairy processing: Dairy-Science-And-Technology-Hanbook.-Volume-3:Applications-Science, Technology,-Engineering. Hui,-Y.H.-ed. New-York,-NY-USA VCH-Publishers pp. 1-76
- Stepaniak, L. Abrahamsen, R.K. (1995). Effect of sampling, recontamination and temperature on microbial quality of pasteurized milk. Milchwissenschaft- Milk Science Internatinal 50: 22-26.
- Suhren, G.; Heescher, W.; Tolle, A.. (1982). Die anwendurg des Limulus test zur untersuchung ultrahochoerhitchler Milch und Ermttlung der bakteriologisch-hygienischen. Wertigkeit des Verwendenten. Rohstoffes. Milch-wissenschaft. 37: 341-346.
- Suhren, G.; Hesselbarth, H.; Heeschen, W.; Südi, J. (1986). Evaluation of the LPS content as determined by the Limulus test in milk and milk

products. II Raw milk and influences of technological procedures. *Milch-Wissenschaft*. 3 (41). 156-160,.

- Suhren, G. (1982). Determination of pyruvate and other metabolites. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 34 (1). 117-123.
- Suhren, G., Heeschen, W. (1991). Determination of pyruvate and other metabolites. *Bulletin of the IDF* 256/1991:37-40.
- Summer, J. (1996). Farm production influences on milk hygiene quality. *IDF Symposium. Bacteriological Quality of Raw Milk*, pp 94-102. Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo, 1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Tamayo, R.; Ronda, S.; Estefo, A. (1996). Inspección microbiológica de productos lácteos analizados entre 1991 y 1994 en la región metropolitana. Santiago, Chile. Abstracts XV Panvet. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias 21-28 de Octubre de 1996. Campo Grande. Ms. Brasil.937.p217.
- Tchango, Tchango, J.; Watier, D.; Eb, P.; Tailliez, R.; Njine, T.; Hornez, J.P. (1997). Modeling growth for predicting the contamination level of guava nectar by *Candida pelliculosa* under different conditions of pH and storage temperature. *J-Ind-Microbiol-Biotechnol*. 1997 Jan; 18(1): 26-9.
- Te-Giffel, M.C.; Beumer, R.R.; Granumm, P.E.; Rombouts, F.M. (1997). Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in The Netherlands. *Int-J-Food-Microbiol*. 1997 Mar 3; 34(3): 307-18.
- Tejedor, R. (1998). Métodos rápidos de análisis microbiológico en alimentos. VI Conferencia Internacional de Ciencia y tecnología de los Alimentos. 23-27 de Marzo. La Habana. Cuba.

- Ternstroem, A.; Lindberg, A..M.; Molin, G. (1993). Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to Pseudomonas and Bacillus: J.-Appl.-Bacteriol. vol. 75, no. 1, pp. 25-34
- Thirapatsakum (1998). Progreso hacia el mejoramiento de la calidad de la leche en Tailandia. Memorias del Congreso Panamericano de Mastítis y Calidad de la Leche. Mexico 23-27 Marzo.
- Tibor, D. (1993). Rapid methods in food microbiology. Rapid Methos and Automation in Microbiology and Inmunology. Londres.

#### TRAM

- Urbanova, E.; Pacova, Z.; (1997). Identification of Citrobacter species and their occurrence in raw products and f
- oods.Vet-Med-Praha. 1997 Mar; 42(3): 87-91
- Vallejo Cordoba, B.; Nakai, S. (1994). Keeping-Quality Assessment of Pasteurized Milk by Multivariate Analysis of Dynamic Headspace Gas Chromatographic Data .2. Flavor Classification by Linear Discriminant Analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 42: 4 994-999.
- Van Crombrugge, J. and Was, G. (1991). Impedance method. Bulletin of the IDF 256/1991:41-44.
- Van Den Verg, (1987). Composition and quality of milk as a basis for payment of farmers. Milk The Vital Forse, 233-238.

- Vanos, V. (1991). Importance of Streptococcus Group D in fermented dairy products, as indicators of quality assurance in comparison with coliforms. Bulletin of the IDF, 264-1991.
- Vasavada, P.C.; Cousin, M.A. (1993). Dairy microbiology and safety: Dairy-Science-And-Technology-Handbook.-Volume-2:-Product-Manufacturing. Hui,-Y.H.-ed. New-York,-NY-USA VCH-Publishers pp. 301-426.
- Vasavada, P.C. (1993). Rapid methods and automation in dairy microbiology. J. Dairy Sci. 76: 3101-3113.
- Vasil Ova. Z. (1989). Evaluation of selected quality parameters of raw milk in relation to Czechoslovak Standard CSN 57 0529, as a function of feeding and technology. Veterinarstvi 39 (4): 177-181.
- Visser, I.J.R.; Groote, J.M.F.H., (1984). The malthus microbiological growth analyser as an aid in the detection of post-pasteurization contamination of pasteurized milk. Neth. Milk Dairy J. 38:151-156.
- Waes, G.; Crombrugge, J. Van; Reybroeck, W. (1989). The ATP-F test for estimation of bacteriological quality of raw milk. IDF: 279-287.
- Weill, R. J., (1994). Pago de la leche por Calidad. V Congreso panamericano de la leche.. Memorias pp.590-596 Medellin. Colombia.
- Wernars, K.; Heuvelman, C.J.; Chakraborty, T.; Notermans, S.H.W. 1991. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. J.Appl. Bacteriol. 70:121.
- White, C.H. (1993). Rapid methods for estimation and prediction of shelf life on milk and dairy products. J. Dairy Sci. 76:

- White, C.H., (1998). Factores que afectan la vida de almacenamiento de los productos lácteos terminados. Memorias del Congreso Panamericano de Mastítis y Calidad de la Leche. Mexico 23-27 Marzo.
- Whiting, R.C.; Oriente, J.C. (1997). Time-to-turbidity model for non-protective type B Clostridium botulinum. Int-J-Food-Microbiol. 1997
- Wolters, G.M.; Boesekamp, J.A. (1996). Effect of re-use of cleaning solutions of milking equipment on raw milk quality. IDF Symposium. Bacteriological Quality of Raw Milk, pp 108-112. Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo, 1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Zangerl, P.; Rapposch, S.; Ginzinger, W. (1996). The BactoScan methods -difficulties with standardization. IDF Symposium. Bacteriological Quality of Raw Milk, pp 146-151. Wolfpassing, Austria, 13-15 marzo, 1996. ISBN 92 90 98.0022.5.
- Zinsser, (1994). Microbiología. Capítulo 5. Fisiología del crecimiento. 20<sup>a</sup> Edición, Edit. Médica Panamericana. pp. 91-97.
- Zuñiga, C.O. (1996). Recolección y acopio de leche. Tecnología Láctea Latinoamericana. No3. pp 42-48.

Opinión del tutor sobre el documento de tesis *Desarrollo y aplicación del sistema Diramic para el análisis bacteriológico de la leche cruda y pasteurizada*, del Dr Juan E. Hernández García, presentado en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias.

La modernización de los laboratorios de análisis de la leche y derivados lácteos es una necesidad nacional, pero para ello se requiere de muchos recursos y/o de mucho ingenio. Este trabajo de tesis se refiere a lo segundo, a la capacidad para adoptar una tecnología cubana dirigida al campo de la salud humana y transformarla mediante la experimentación científica al campo de los laboratorios lácteos.

El compañero Juan Emilio Hernández tiene una formación básica de médico veterinario y se desempeña como profesor de Higiene de los Alimentos en la Sede Universitaria Sancti Spiritus, pero el trabajo presentado lo realizó en el campo del análisis microbiológico automatizado de la leche, abordando incluso la validación de la metodología, mediante estudios interlaboratorios, un tema nunca antes desarrollado en el país, bajo los requisitos establecidos por las normas ISO. Estos estudios son poco frecuentes a nivel internacional.

El documento de tesis tiene una secuencia integradora, donde el aspirante ha demostrado un amplio dominio del tema y de la metodología de investigación científica necesaria para lograr un resultado final de éxito.

El Dr Hernández ha mostrado un alto nivel de constancia en el trabajo y de sacrificio personal, unido a una excelente capacidad para organizar y dirigir los diferentes ensayos, así como, para la realización personal de prácticamente todo el trabajo experimental.

Los resultados obtenidos en el material de tesis han sido evaluados en la práctica y constituyen una importante contribución al sector lechero nacional.

Ing. Pastor Ponce Ceballos Dr C.