

Detección de *Staphylococcus spp* en leche entera empleando el Sistema Diramic (Detection of *Staphylococcus spp* in whole milk using the Diramic system)

Dra. Dayorka Herrera Suárez, Msc, DraC. Mabelin Armenteros Anaya, Dr. José Álvarez Lamazares.

Universidad Nacional Agraria de la Habana, Cuba

Contactar:
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/dayorka>



RESUMEN

Enfrentar un desafío tecnológico es el mayor problema que tiene actualmente el desarrollo de los Laboratorios de Control Lácteo en América Latina y el Caribe. La detección de microorganismos patógenos en la leche y/o sus derivados se hace cada vez más importante, debido a la influencia que tienen en la presentación de las enfermedades transmitidas por los alimentos. **Staphylococcus spp** ha sido considerado como el germen más frecuentemente asociado con este tipo de brotes. En este estudio se aplicó una metodología de trabajo para el conteo de dicho microorganismo en leche entera a partir de señales turbidimétricas con el Sistema Diramic. Se determinó que en el mismo se pueden detectar diferentes niveles de contaminación en leche estéril inoculada y en muestras de producción. Se comprobó su efectividad, al detectar muestras negativas y positivas a **Staphylococcus spp** y se determinó en el caso de las muestras positivas que a partir de las 6 horas de incubadas se presentan Diferenciales Turbidimétricos por encima de 200, lo que se corresponde con conteos de 10^4 ufc/ml, a las 8 horas, 10^3 ufc/ml y a las 10 horas 10^2 ufc/ml. Se observan ventajas en comparación con el método de referencia de conteo en placa, al minimizarse el tiempo de lectura y la cantidad de medio de cultivo a emplear. Los resultados demuestran que entre los múltiples usos que tiene el Sistema, la detección de *Staphylococcus spp* por señales turbidimétricas, puede ser incluida dentro de ellas.

Palabras claves: Diramic, diagnostico rapido, Staphylococcus, leche entera

Abstract

The technological challenge is the main problem for development of the Latino American and Caribbean Milk Control Laboratories. The detection of pathogenic microorganisms in milk and milk derivatives is raising its importance, due to its influence in the occurrence of diseases transmitted by aliments. **Staphylococcus spp**, has

been considered as the etiological agent most frequently associated with this type of entity. In this work a methodology was applied, for counting this microorganism in whole milk by turbidimetric signals with the Diramic System. It was determined that with the system, several levels of contamination could detect in sterile milk and in samples coming from production units. It was confirmed its

Herrera Suárez, Dayorka; Armenteros Anaya, Mabelin; Álvarez Lamazares, José. **Detección de *Staphylococcus spp* en leche entera empleando el Sistema Diramic** - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](#)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 05, Mayo/2005. [Veterinaria.org](#)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](#)® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505.html>

efectivity, to detect negative and positive samples to **Staphylococcus spp** and it was determined that in the cases of positive samples, turbidimetric differentials are present over 200, from six's hours of incubation, which corresponded to 10^4 Ufc/ml; 8 hours 10^3 ufc/ml and 10 hours 10^2 ufc/ml. Advantages were observed comparing the method of reference (plaque counting)

minimizases reading time and the quantity of culture media to be employed. It was demonstrated that among the many uses of Diramic System, the detection of **Staphylococcus spp** by turbidimetric signals, could be included.

Password: Diramic, **Staphylococcus**, whole milk, turbidimetric

INTRODUCCIÓN

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, 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. Existen en el mundo desarrollado equipos con altas tecnologías, los cuales son costosos y por ende no se pueden adquirir por nuestro país para el uso en nuestra industria láctea. En la clínica médica 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. El principio de medición del Sistema es la turbidimetría que se ha utilizado para el cálculo aproximado del contenido total de microorganismos. Recientemente se ha establecido una metodología de trabajo aplicable en este campo de análisis, a partir de la cual se pueden registrar cambios turbidimétricos en leche cruda y pasteurizada utilizando la tecnología básica del Sistema Diramic y se valora su relación con el nivel de contaminación bacteriana (Hernández,1998).La aplicación de dicha metodología posibilita la clasificación de la leche cruda según niveles de contaminación. El desarrollo de investigaciones en este campo es altamente promisorio ya que se parte de una tecnología nacional de reconocido prestigio en el país y otras partes del mundo cuyo costo es inferior al de equipos con principios y/o fines similares, manteniendo indicadores satisfactorios de sensibilidad y productividad que pueden permitir además detectar y/o cuantificar la presencia de microorganismos patógenos en leche cruda, como sería el caso de Staphylococcus spp. Por tanto los **objetivos** de este trabajo son:

- * Desarrollar una tecnología analítica que posibilite el uso del Sistema Diramic en la detección de Staphylococcus spp en leche cruda al compararlo con el método de referencia bajo condiciones controladas de Laboratorio.
- * Evaluar la metodología establecida para determinar el nivel de contaminación por Staphylococcus spp de la leche cruda en condiciones de producción.

Experimento 1.

Desarrollo de la metodología y establecimiento de los indicadores de calidad para la detección de Staphylococcus spp en leche cruda.

Materiales y Métodos

La cepa de trabajo empleada fue: Staphylococcus aureus ATCC 25923. Como método de referencia se utilizó la Norma FIL: 1990 y Norma ISO 6888-1:1990 para el conteo de Staphylococcus aureus.

Procedimiento de trabajo con el Sistema Diramic

Se contaminaron muestras de leche reconstituida estéril con un inóculo de Staphylococcus aureus hasta obtener concentraciones de 10^1 hasta 10^6 ufc/mL. Partiendo de cada una de estas muestras se procedió a obtener diluciones seriadas hasta 10^{-3} , sembrando 0.5 mL en 3.5 del medio selectivo (Baird Parker sin Agar) de la dilución 10^{-3} , las cuales se incubaron a 37°C , realizándose las lecturas a las 0, 6, 8, 10, 12 horas. La diferencia de turbidez (DT) respecto al tiempo 0 reportada por el Sistema Diramic fue considerada de valor interpretativo cuando este era superior a 200 como valor absoluto según Hernández, 1998.

Lecturas turbidimétricas

Para las lecturas turbidimétricas se procedió a la calibración del Sistema. Una vez calibrado el Sistema los incrementos turbidimétricos se detectaron por intersección, registrándose para ello la absorbancia inicial y a partir de esta los diferenciales turbidimétricos (DT) a las diferentes horas de incubación. 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: 1990 e ISO, 1999), para el conteo de Staphylococcus aureus y las diluciones señaladas que permitió junto con el volumen del medio una transparencia adecuada para la sensibilidad del Sistema.

Se estableció la relación de el Diferencial turbidimétrico y el Conteo de Staphylococcus aureus en leche. Para ello se procedió de acuerdo a lo anteriormente expresado utilizando 3 réplicas por dilución y con tiempos de lectura de 0,6,8,10, 12 horas.

En todos los ensayos a las muestras de leche se les realizó el conteo de Staphylococcus aureus, por el método convencional de conteo en placas (FIL:1990, ISO,1999).

Experimento 2.

Utilización del Sistema Diramic en el monitoreo de *Staphylococcus spp* en condiciones de producción.

Materiales y métodos.

1. Origen de las muestras

Se procesaron 211 muestras provenientes de vacas individuales y tanques colectores de diferentes Empresas Pecuarias de la Provincia Habana, para evaluar mediante la metodología de trabajo con el Sistema Diramic, el conteo de *Staphylococcus spp* en leche cruda.

2. Procedimiento para la toma de muestra.

Se tuvieron en cuenta las Normas Nacionales e Internacionales que rigen dicho procedimiento (NC-78-25, 1986; Norma CEE, 1991, ISO 707-1998).

3. Procesamiento de las muestras y lectura

La muestra de leche se homogenizó y se tomó 1 mL para adicionarlo a 9 mL de Solución Salina Peptonada (SSP), seguidamente se prepararon diluciones decimales y se procedió a la aplicación de la metodología establecida para el empleo del Diramic en el primer experimento.

4. Muestras de leche cruda. Análisis de las muestras.

Para el conteo de *Staphylococcus spp* en leche cruda, se evaluaron y clasificaron por el Sistema Diramic y por el método de referencia el 100% de los casos, así como se valoró el Conteo Total de microorganismos mesófilos (IDF.100B:1991), psicrófilos (IDF 132A:1991) y coliformes totales (ISO 5541/1) al 30% de las muestras.

A un 10% de las muestras se les realizó aislamiento de las cepas predominantes, las cuales se analizaron microscópicamente. Las colonias fueron sembradas en AN e incubadas 24-48 horas a 30 ° C y a partir de los cultivos puros se procedió a realizar la tinción de Gram para observar si existían otros crecimientos.

Resultados y Discusión.

En el desarrollo de la metodología de trabajo con el Sistema Diramic para el conteo de *Staphylococcus spp* obtuvimos resultados satisfactorios al utilizar patrones de leche con diversos grados de contaminación. El sistema fue capaz de detectar niveles de contaminación una vez que las muestras fueron incubadas a 37°C con un tiempo menor mínimo de lectura. Tenemos que a partir de las 6 horas de incubadas las muestras, ya se observan para niveles de contaminación de 10^4 y 10^5 ufc/ml, diferenciales turbidimétricos por encima de 200, una vez que transcurre el período de incubación de las muestras vemos como los mismos se van incrementando, apareciendo para concentraciones de 10^3 ufc/mL alas 8 horas, para 10^2 ufc/mL a las 10 horas y no detectándose cambios a concentraciones menores que esta (Tabla 1).

Tabla 1. Valores medios de los Dt frente al conteo en placa.

Niveles de contaminación	6	8	10	12
10^1	21.8	81.1	116	128
10^2	60.5	86.8	227.5	393
10^3	24.3	254.1	266.5	339
10^4	242.6	381.6	422.3	1488
10^5	336.6	382.5	554.5	2645
10^6	432.0	498.5	1275.6	3631

Una vez realizado el estudio en las diferentes vaquerías, se demostró que la contaminación por *Staphylococcus* era elevada, encontrándose las medias entre 10^2 y 10^4 ufc/ml. , lo cual representa un parámetro negativo para estas unidades. Este número de muestras contaminadas representa el 43,1% de las muestras analizadas Al procesar las muestras mediante el Sistema Diramic se pudo comprobar que a medida que aumenta el nivel de contaminación, se incrementan los Dt, como se evidenció anteriormente al trabajar muestras de laboratorio, comportándose como se refleja en la tabla2.

Tabla 2. Variaciones de los Dt en el tiempo en los diferentes niveles de contaminación. Muestras de producción.

Ufc/ml	Dt/Tiempo de incubación			
	6	8	10	12
102	41.4	177	455	828
103	47.5	239	581	1000
104	301.1	524	1069	1567

Por otra parte al realizar un análisis de las muestras que resultaron negativas tanto por el Sistema Diramic, como por el método de referencia de conteo en placa, se pudo comprobar que los DT permanecieron por debajo de 200 hasta las 12 horas de incubadas las muestras.

Las características del Sistema se pueden resumir de la forma siguiente:

- ★ Los resultados son obtenidos en un lapso de tiempo razonable, a partir de las 6 horas ya se pueden obtener conteos de 10^4 ufc/mL, a diferencia del método de referencia que lo hace en 24 horas.
- ★ 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 para la determinación de Staphylococcus.
- ★ 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 entre un 85-90%.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo una metodología analítica para detectar Staphylococcus spp en leche cruda empleando el Sistema Diramic.
- La detección de Staphylococcus spp en leche cruda se comportó dentro de los parámetros de calidad establecidos.
- Se aprecia la posibilidad de un nuevo uso del Sistema Diramic en el conteo de Staphylococcus spp en leche cruda.

RECOMENDACIONES

- Validar la metodología obtenida para el empleo del Sistema Diramic en el conteo de Staphylococcus spp en muestras de producción como alternativa al conteo en placa.
- Desarrollar otros estudios de evaluación del Sistema Diramic en la detección de otros patógenos.

Trabajo recibido el 01.02.05 nº de referencia 050503_RED VET. Enviado por su autor, dayorka, miembro de la [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) ®. Publicado en REDVET® el 01/05/05. Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org - www.veterinaria.org y REDVET® www.veterinaria.org/revistas/redvet y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](#). (Copyright) 1996-2005. [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](#), ISSN 1695-7504 - [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org)