

## **Métodos de ensayos rápidos de detección de microorganismos en la leche** (Methods of quick rehearsals of detection of microorganisms in the milk)



**Ing. Nuria Dávila Fernández y Dr. C. Juan Emilio Hernández García.**

Instituto de Investigaciones en Normalización, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Sede Universitaria de S.Spíritus. Maestría en Higiene Veterinaria de los Alimentos Universidad Agraria de la Habana, Cuba.

Contacto con los autores: Ing. Nuria Dávila Fernández MSc. Especialista en Normalización y Calidad. Dpto. Química General. Instituto de Investigaciones en Normalización. ININ. Telef: (537) 8610844 8624701 Fax (537) 8612561. email [ndavila@inin.cu](mailto:ndavila@inin.cu) Reina 412 e/Gervasio y Escobar. Ciudad de la Habana, CP.10300. Cuba.

### **RESUMEN**

El trabajo se desarrolló a partir de la necesidad de conocimiento y actualización de los diferentes métodos rápidos en la determinación de microorganismos en leche, toda vez que la leche constituye uno de los alimentos básicos para los animales mamíferos, incluyendo el hombre. La revisión abordó un acápite relacionado con la calidad microbiológica de la leche, en la cual se exponen los beneficios y perjuicios que representa la presencia de diferentes microorganismos, para la salud del consumidor como para su comercialización. Se hace referencia a la existencia de un grupo de microorganismos que son tomados como indicadores en la Industria Láctea para comprobar el cumplimiento de la aplicación de las buenas prácticas higiénicas. Posteriormente se describen los diferentes métodos convencionales existentes que son utilizados por los laboratorios en la microbiología alimentaria, permitiendo establecer un punto de partida para que en el siguiente bloque se describan los métodos rápidos y/o automatizados de diagnóstico de la calidad higiénico sanitaria de la leche y sus productos y detección de patógenos lo que constituye en los últimos años una necesidad enfocada a la obtención de una 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 en el mercado. Como resultado del análisis de este trabajo se concluyó que estos métodos rápidos presentan aspectos en común que los hacen ser una herramienta importante en el trabajo del laboratorio para determinación de microorganismos en leche.

**Palabras Claves:** leche, microorganismos, laboratorio, métodos rápidos, patógenos.

## ABSTRACT

This work resulted from the need to know and update different quick methods for the determination of microorganisms in milk, a basic foodstuff for mammals, including man. The review covered a clause related to milk's microbiological quality where a description is made of the advantages and disadvantages of these microorganisms for the health of consumers as well as for marketing purposes. Reference is made to the existence of a group of microorganisms taken as indicators in the Dairy Industry to check the fulfillment of good hygienic practices. Then the different conventional methods used by food microbiology laboratories are described, which makes it possible to define a starting point to describe in the following block the quick and/or automated methods to diagnose hygienic-sanitary quality of milk and its byproducts and detect pathogens, a need established in the last few years to get an answer as soon as possible in order to take corrective actions for possible gaps in the hygiene of some stages along the chain of production before the product is released to the market. As a result of the analysis made in this article, it was concluded that these quick methods have common aspects that turn them into an important tool for laboratory work to determine microorganisms in milk.

**Key words:** milk, microorganisms, laboratory, quick methods, pathogens.

## INTRODUCCIÓN

La necesidad de obtener productos de calidad es un reto que día a día se impone en las Industrias de Alimentos. Estas buscan una estandarización de sus productos, para lo cual es fundamental el control sobre la materia prima. Las Industrias Lácteas han de dotarse de conocimientos y tecnologías con las cuales conocer las características y la calidad de los productos que obtendrán, evitando manufacturar productos de baja calidad y aplicando métodos como la determinación de puntos críticos de proceso y la implantación de un código de Buenas Prácticas de Elaboración y Distribución. De esta forma se contribuye a un aumento de la calidad del producto alimenticio terminado.

La leche es el alimento más completo que entrega la naturaleza y tiene grandes posibilidades industriales para obtener diversos productos para la alimentación humana, industria farmacéutica y otros. Es considerada como un alimento completo puesto que contiene elementos nutritivos en cantidades adecuadas para el funcionamiento correcto de los procesos bioquímicos que se producen en el organismo (Mardones, 1994). Sin embargo el estricto cumplimiento de las medidas higiénico sanitarias deben ser una premisa para garantizar que la leche se obtenga con una calidad óptima, aspectos que son fácilmente de corroborar en los análisis que se realizan en un laboratorio (Ponce y Armenteros, 1999). Los análisis microbiológicos y físicos-químicos que se le realizan no tienen carácter preventivo, sino que son inspecciones que permiten valorar la calidad del producto. Sin embargo la rapidez con que se realicen estas determinaciones va a proporcionar la disminución del tiempo de liberación de este alimento para el consumo, generalmente dirigido a la población más vulnerable. Esto a motivado al desarrollo de métodos rápidos y/o automatizados en el diagnóstico de la calidad de la leche y sus productos. Constituye además en los últimos años una necesidad. Bajo las nuevas concepciones de calidad y

comercialización que predominan en este sector, el enfoque fundamentalmente se dirige hacia la obtención de una respuesta en el menor tiempo posible, lo cual hace que se tomen 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 (Bishop, 1998).

El presente trabajo pretende recoger a partir de una revisión bibliográfica, los métodos rápidos de análisis para determinar la calidad de la leche. Estos métodos son implementados y validados por las organizaciones e instituciones que regulan y editan normas, guías y regulaciones como son la OPS, OMS, ISO, FIL-IDF y Codex Alimentarius.

## **DESARROLLO**

### ***Calidad microbiológica de la leche***

La complejidad bioquímica de la leche en su composición y su elevada actividad de agua la convierte en una de los alimentos naturales donde proliferan fácilmente la mayor parte de los microorganismos y bien se podría catalogar como un medio universal de cultivo (Hesschen, 1996)

Los microorganismos en la leche tienen varias orientaciones. Unos son beneficiosos por las transformaciones que producen y otros perjudiciales y su control presenta aspectos sanitarios y comerciales, el primero se refiere al riesgo que el alimento puede suponer para la salud del consumidor cuando es portador 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 flora saprofitaria, esta en elevadas concentraciones puede producir defectos y disminución de las propiedades nutritiva y organolépticas del producto.

Existen grupos de microorganismos (M.O) que son tomados como indicadores en la Industria Láctea, pues su presencia permitirá comprobar el cumplimiento de la aplicación de las buenas prácticas higiénicas.

M.O indicadores:

- Bacterias aeróbicas mesófilas
- Coliformes totales y fecales
- Enterobacterias totales
- Enterococo

Los métodos de análisis para evaluar la calidad higiénico sanitaria de la leche han evolucionado sustancialmente desde la década de los 60, llegando a oficializarse los métodos convencionales de conteo en placa. Estos métodos universalmente conocidos tienen limitantes como son el excesivo tiempo de realización, amplia laboriosidad y utilización de gran cantidad de medios de cultivo, placas y otros insumos (Tejedor, 1998).

### ***Métodos convencionales utilizados en la microbiología alimentaría.***

#### Examen directo:

Cuando se examinan alimentos, no se debe desaprovechar la posibilidad de descubrir la presencia de microorganismos observando la muestra directamente al microscopio. Se puede montar una preparación con pequeña cantidad de material de la muestra y suspenderla en una gota de agua en un portaobjeto, cubrirla con un cubreobjeto y examinarla. En estos casos alternativamente puede utilizarse la iluminación de campo oscuro o la microscopía de contraste de fases.

Resulta relativamente fácil ver las levaduras y los mohos en esta preparación y, con cuidado y paciencia, es posible ver las bacterias. El elevado índice de refracción de las endoesporas bacterianas las hace especialmente fáciles de ver con óptica de contraste de fases, y si la preparación se hace como gota pendiente en el cubreobjeto montado sobre portaobjeto excavado, también es posible determinar si las bacterias son móviles.

Para que los M.O se puedan observar por esta técnica deben de estar presentes en concentraciones muy elevadas habitualmente en el orden de  $10^6$ . La gran ventaja de esta técnica es su rapidez, aunque en sus formas más sencillas no diferencia las células vivas de las muertas.

#### Técnicas de cultivo:

Un examen microbiológico completo requiere que cada una de las células viables sean estimuladas para que se multipliquen en medios líquidos o en superficies, o en la matriz, de un medio solidificado de agar. El microbiólogo tiene a su disposición una amplia gama de medios de cultivos cuyos pormenores de composición y modo de empleo se pueden encontrar en varios textos y manuales fácilmente asequibles.

Los ingredientes de los medios de cultivos, por su naturaleza y función, pueden ser agrupados como se describen a continuación:

**-Agua.**

**-Bases nutritivas:** (peptonas, hidrolizados y digeridos, extractos, infusiones y dializados.)

**-Carbohidratos:** (azúcares, agar y derivados, almidones, otros)

**-Sales minerales:** (macroelementos, fósforo, azufre, sodio; microelementos, zinc, cobre, etc.)

**-Colorantes e indicadores.**

**-Factores de crecimiento:** (vitaminas, proteínas, otros)

**-Otros:** (antibióticos, lípidos)

Los medios de cultivos pueden ser clasificados según la promoción de crecimiento de determinados microorganismos en:

**De enriquecimiento:** Por lo general son medios líquidos, pudiendo ser semi-sólidos en algunos casos, que contienen sustancias que estimulan el crecimiento de los M.O y permiten el desarrollo de la población microbiana a partir de un número reducido de células de determinados gérmenes.

**Selectivos:** En su mayoría son sólidos, contienen sustancias que inhiben el crecimiento de los M.O, o sea, previene el crecimiento de especies acompañantes indeseables.

**Electivos:** Toleran el crecimiento de varias especies de M.O y a la vez facilitan la identificación de colonias de interés, garantizándoles los nutrientes mínimos necesarios para su desarrollo.

#### Métodos de recuento:

**Recuentos en placas:** En un laboratorio convencional normal el método más sensible para descubrir la presencia de una bacteria viable consiste en permitir que aumente su tamaño por si sola para formar una colonia visible. Este constituye el principio de la siembra en placa por difusión y de la siembra en placa por estría.

En el método de siembra en placa por difusión, la muestra (generalmente 1 mL) se pipetea directamente a una placa de petri estéril y se mezcla con un volumen de agar fundido enfriado a 40-45°C.

#### Recuento por el método del Número Más Probable (N.M.P)

Es un método alternativo para efectuar el recuento de cifras bajas de M.O viables. El mismo se suele basar en la inoculación de series dobles de tubos (3, 4 ó 5) que contienen un medio líquido apropiado y se siembran con tres volúmenes diferentes de muestras o con tres diluciones diferentes del material a examinar (10g, 1g, 0.1g). El N.M.P se obtiene recurriendo a tablas concebidas para tal efecto.

#### ***Métodos rápidos de diagnóstico microbiológico en leche.***

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 enfocada 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 en el mercado. (Bishop, 1998).

Estos métodos rápidos de diagnóstico bacteriológico en leche se han clasificado atendiendo a diferentes puntos de vistas, no obstante, en lo fundamental han tomado como base los aspectos siguientes: Rapidez con que se obtienen las respuestas (Hescheen, 1996), la actividad metabólica de los microorganismos. (Easter, 1989), posibilidades de automatización (Baumgart, (1996) y principios de medición en que se basan las lecturas, (Reybroeck, 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 tres grupos: métodos directos, indirectos y en métodos para diagnóstico de microorganismos específicos.

#### Métodos directos

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

El *CDM* del número de bacterias en muestras de leche cruda se basa en la técnica desarrollada por Breed (1911). 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.

El *CDM* es un método rápido para estimar el grado de contaminación bacteriana 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, más práctico y más barato que un conteo directo ejecutado adecuadamente. Si el método se contemplara como un método para estimar la calidad de la leche con propósito de pago, su uso sería limitado para pequeño número de muestras con alto conteo bacteriano ( $2.3 \times 10^6$  ufc/mL) debido a la insensibilidad del método.

*La Técnica de la Epifluorescencia Directa sobre Filtro (DEFT)* 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 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 las que la ha excitado previamente.

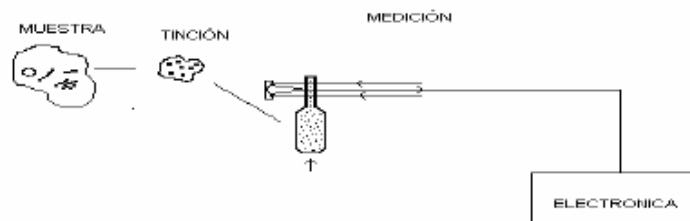
Estos colorantes usados se combinan con el DNA y RNA de las células bacterianas y ello depende fundamentalmente de la edad, ciclo y fisiologismo del microorganismo, ya que las células en crecimiento tienen el cociente RNA/DNA elevado. La muestra de leche se trata previamente con enzimas como la tripsina o tritón para facilitar la filtración, (Dassen et al. 1992).

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. Dentro de estos equipos tenemos el *BACTOSCAN* que produce resultados en 7 minutos y parece ser apropiado para la clasificación de la leche sobre la base de un límite de clase de media igual a  $5 \times 10^4$  ufc/mL. Aquí las bacterias son separadas de una muestra de 2.5 mL la cual es tratada 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 y entonces teñir 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.

El *AUTOTRACK* es la otra versión automatizada de este método, desarrollada inicialmente para trabajar con vinos y en estos momentos se emplean en otros alimentos.

### **RECUESTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS INSTANTÁNEO - CITOMETRÍA DE FLUJO - PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO.**



El *Método de Dispersión en Placa* fue adaptado ampliamente para la estimación de la calidad de la leche y se 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°. 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 el vaciado de las placas, incubación y conteo de colonias que se lleva a cabo de la misma forma que el método convencional de conteo en placa o CSP.

Varios métodos desarrollados tienen mecanizada o automatizada la técnica de dispensador de placa, tal es el caso del *PETRIFOSS* y *MINI-PETRIFOSS* en Dinamarca que dependiendo del instrumento pueden prepararse de 300-600 placas por hora en 1 o 2 diluciones (Brodsky y Celben, 1980).

Otro instrumento más simple es el *AUTOLOOP* desarrollado en 1979 por Malcolm. 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. Puede decirse que este método incrementa la velocidad con la cual las muestras pueden diluirse y depositarse en las placas de petri aunque no reducen o acortan el tiempo de incubación por el CSP de 72 horas a 30°. 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).

*El Sistema de Conteo en Espiral* dispone de un dispensador 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 dispensador 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).

*El Sistema Petrifilm*, consiste en dos piezas filmicas que contactan con el nutriente de medio en su estado sólido. La muestra diluida es aplicada sobre el film y después de incubada, las colonias son contadas mediante el revelado (Reybrodeck, 1996). La técnica se ha empleado en la estimación de psicrófilos con resultados aproximados de 48 horas incluyendo el período de preincubación. Los valores de correlación son posibles entre 75 y 80 y se plantea como ventaja la ausencia de costo inicial significativo y el bajo costo por muestra.

#### Métodos indirectos.

Los métodos indirectos están relacionados con la actividad metabólica o con mediciones de constituyentes específicos de la célula durante el crecimiento y los mismos se clasifican 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 periodo de incubación en el cual se producen cambios físicos o bioquímicos en el medio. Mientras que el segundo grupo esta 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 de la transformación de los componentes del sustrato durante el almacenamiento. Estos dos últimos grupos no requieren períodos largos de incubación, (Grappin, 1989).

En los métodos rápidos se elige la detección de una señal físico-química resultante de la actividad específica de los M.O contaminantes a detectar. Partiendo del criterio de que los M.O son muy pequeños y difíciles de analizar. En un principio, las poblaciones microbianas no se encuentran en condiciones de hacerse oír en medio de las interferencias que las rodean. Una forma de subsanar esta dificultad consiste en dotar a las células que se pretende detectar de un timbre particular que las distinga y las haga sobresalir, y para ello es suficiente utilizar una señal físico-química específica, que puede ser: a) un marcaje más o menos directo de las propias células microbianas o b) una característica ligada a una modificación físico-química del medio, consecuencia del crecimiento y multiplicación de los gérmenes de contaminación (Barcina et al. 1989).

a) *Primer grupo: Actividad metabólica*

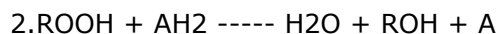
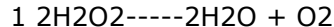
### **1- Tensión de oxígeno.**

El O<sub>2</sub> es el primer aceptor de electrones para muchos M.O en el proceso de respiración y metabolismo, excepto en l de los anaerobios obligados, la reacción o volumen de consumo de O<sub>2</sub> es proporcional a la actividad metabólica y número de M.O.

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. La técnica puede ser aplicada para detectar y conocer la actividad de la población microbiana total en muestras de leche. L disminución del contenido de O<sub>2</sub> de la leche durante el almacenaje e incubación se debe al contenido de bacterias (Lück et al.1970). Un trabajo realizado por Gaida et al. (1990) con un microrespirómetro basado en la medición del consumo de O<sub>2</sub> a una presión y volumen variable para estimar la carga bacteriana de la leche cruda resultó satisfactorio.

### **2- Catalasa.**

La catalasa es una enzima presente en las células de la mayoría de los animales y plantas, la cual cataliza la reacción



No está tan claro si el papel de la catalasa es solamente es solamente descomponer el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o también catalizar mediante la catalasa y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incluyendo metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles.

Se escriben dos métodos para esta determinación, uno es el método de la columna de gas con pipeta de Pasteur y el segundo sistema es el que se conoce comercialmente como CATALASAMETER (equipo automatizado), usando el método del disco de flotación. El principio esta dado por el tiempo de flotación del disco de papel que contiene catalasa en el tubo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la presencia de altos niveles de catalasa indican, niveles altos de M.O catalasa positivos, el tiempo de flotación sería muy largo o nulo. El problema con dicha prueba es la interfase a partir de bacterias catalasa negativos y la catalasa proveniente de los tejidos, por lo que se necesita más investigaciones sobre esta prueba, justificado ello por la rapidez de la misma (Fung, 1994).

### **3- Reductasa.**

Los tests 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 *Trifenilfetrazolium*, 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 psicrófilos, 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 (Ponce, 1989).

### **3- Citocromo E oxidasa.**

Esta enzima cataliza la reducción del oxígeno a H<sub>2</sub>O y es una importante terminal en el mecanismo de la respiración de ciertas bacterias, la misma puede ser utilizada como una medida de actividad metabólica y del número de M.O. 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 fue utilizada en la determinación y enumeración de psicrófilos Gram negativos en leche, la misma es simple, fácil y rápida brindando resultados en 5 min. El método puede detectar 10<sup>4</sup> ufc/mL o más, no siendo sensible para determinar organismos psicrófilos en leche pasteurizada fresca. Aunque luego de un período de preincubación puede ser utilizada para predecir la calidad de la leche pasteurizada y productos lácteos (Kroll, 1989).

### **4- Microcalorimetría.**

Se basa en la medida de los pequeños cambios en la producción de calor resultante del crecimiento microbiano, estando implicadas las modificaciones en 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 la diferenciación entre las Enterobacterias. Para la determinación de los datos microcalorimétricos se obliga el empleo de calorímetros especiales, los cuales pueden ser automatizados o computarizados, los dos tipos más utilizados son los *Calorímetros adiabáticos* y los *Fluxométricos térmicos*. El *CALVET* es uno de los más empleados. Gaida et al. (1990) plantea 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 requiere una inversión elevada (Goldschmidt, 1991)

### **5- 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 M.O en cuestión con la consiguiente formación de productos finales intracelulares, los cuales fluorescen a la luz ultra violeta. La fluorescencia de las levaduras es detectada por el flujo citométrico y llevadas al display del Instrumento, en dependencia del número e intensidad de la partícula fluorescente. El método toma alrededor de 30 min. incluyendo el tiempo que se toma en la preparación de la muestra.

El Instrumento tiene un alto costo pero el tiempo de análisis es muy rápido, aproximadamente 2 min y puede detectar menos de 100 lev/mL. Con preincubación de 24'48 hors, el método puede detectar 1 lev en 10 y 100 grs respectivamente (Reybroeck, 1996). Además proporciona un histograma que da el número de partículas fluorescentes, así como la intensidad de fluorescencia, lo cual da una información adicional para la interpretación de los resultados.

### **7- Impedancia.**

La observación de las variaciones de impedancia debidas al metabolismo microbiano se reportó por primera vez en el año 1998 por Steward. 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 los cambios electroquímicos de un medio de cultivo inoculado que dependen de la actividad metabólica de los M.O. Generalmente sustratos no cargados (ejemplos proteínas que son metabolizadas 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 y esta puede ser medible insertando sensores en el medio de cultivo inoculado.

La técnica se ha utilizado con éxito para predecir la vida útil de alimentos como la leche y quesos. La prueba puede ser específica para ciertos grupos de M.O 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).

### **8- Turbidimetría.**

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. Las bacterias (y cualquier otra materia suspendida), absorben y dispersan la luz transmitida la cual es medida de una frecuencia fija registrando así los cambios turbidimétricos del medio de cultivo líquido al relacionarlo con el control estéril, cambios cualitativos que indican el crecimiento microbiano y los mismos pueden ser cuantificables cuando son calibrados contra parámetros cuantificables conocidos, tales como el conteo celular y/o el peso seco (Easter, 1998).

El *Método Turbidimétrico* es incluido en la mayoría de las diferentes revisiones sobre métodos rápidos de diagnóstico microbiológico empleados en alimentos (White, 1993 y Fung, 1994). En estudios realizados por Dalgard et al, (1994) 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 absorbancia. Ambos fueron comparados con las estimaciones

obtenidas por el método de conteo de viables, concluyendo que las mediciones turbidimétricas pueden ser utilizadas confiablemente para la estimación de  $\mu(\max)$ .

b) *Segundo grupo*

**1- Bioluminiscencia.**

La *Bioluminiscencia* es otra técnica muy interesante. Se basa en una serie de reacciones enzimáticas (generalmente a cargo de oxidasas) que cursan con una emisión 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 M.O ya que el contenido de ATP en las células bacterianas es generalmente constante (1 fg ATP/cel) sobre circunstancias determinadas en las cuales la luciferina y luciferasa estén en exceso (Rodríguez, 1991).

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. La sensibilidad de la prueba se ha movido desde 104 hasta  $1 \times 10^7$  ufc/mL, con el empleo de equipos semi-automatizados como el *LUMAC RAW MILK MICROBIAL* o más automatizado como el *BACTOFOSS*.

**2- 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 (LSP) y las mismas pueden ser detectadas por la formación de un gel o mediante ensayos colorimétricos usando un LAL (limulus amebocyte lysate) como reactivo. Este es preparado a partir de sangre del cangrejo de herradura *Limulus polyphemus*.

Una versión turbidimétrica de la prueba de limulus se utiliza para evaluar la flora Gram negativa en leche cruda. El valor de la prueba descansa en la rapidez con que pueden obtenerse los resultados, pudiéndose seleccionar los alimentos que tengan títulos elevados con esta prueba y ensayarlas después con otros métodos, mientras que los que tienen títulos bajos pueden situarse de inmediato en la categoría de alimentos pocos contaminados por bacterias Gram negativas viables (Mottar, 1987).

Esta técnica ha sido evaluada por Moody et al. (1996) quien indicó que el procedimiento de microplaca (LAL) puede usarse exitosamente en lugar del procedimiento en tubos. El procedimiento (LAL) entrega buenos valores de correlación (iY 0.85) cuando el suministro de reactivo es disponible. Las endotoxinas "Backgrounds" de la cristalería, agua, etc, pueden afectar los resultados con estos procedimientos, por lo tanto, deben tomarse extremo cuidado respecto a esto.

c) *tercer grupo*

### **1- 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 es relativo al conteo inicial de la leche, pues proviene de otras fuentes como los leucocitos, además el nivel de piruvato presente en la leche limita la utilidad de esta prueba para bajos niveles de M.O donde el piruvato 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 ( $1 \times 10^8$  ufc/mL). La prueba tiene como ventajas su rapidez y facilidad de automatización (Suhren et al, 1991).

### ***Métodos rápidos para detectar microorganismos patógenos.***

Los métodos rápidos de diagnóstico de M.O patógenos y sus toxinas son necesarios para la protección al consumidor, máxime si se tiene en cuenta que los métodos convencionales requieren generalmente de varios días y por otro lado poseen menos sensibilidad, especificidad y selectividad. Técnicas como el *Inmunoensayo* (June, 1992), la *Hibridación de Ácidos Nucleicos* (Curiale, 1990), *Inmunodifusión* (Flower y Klark, 1998) y la *Conductividad Eléctrica*, son técnicas utilizadas para detectar patógenos en alimentos tales como la *Salmonella*, *Listeria* y otros. En los últimos años se han estado utilizando métodos basados en la Inmuncaptura magnética (Gooding y Chudary, 1997), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por la amplificación material genético, las pruebas con genes lux (Reybroeck, 1996) y otras de tecnologías genéticas.

#### *Inmunoensayos*

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, este test emplea micro ELISA acompañada de Ac monoclonales para *Salmonella* o *Listeria*. En estudios efectuados sobre las 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. (June, 1992).

#### *Agglutinación Latex*

Este es el método más simple de los Inmunoensayos desarrollados recientemente. El test usa partículas de Polietileno latex las cuales contactan con el anticuerpo. En presencia de

antígenos en la muestra, la reacción se verifica después de la incubación, si no existe 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 M.O patógeno, después de un período de incubación para que permita la inmunocaptura, el material no unido al inmunoconteo puede ser rápidamente eliminado mediante fuerza magnética. Dos test para detectar Listerias han sido ensayado y los mismos no requieren períodos de preenriquecimiento, el método ha sido capaz de detectar una Listeria en muestras que contienen  $>1 \times 10^4$  ufc/mL banales. La sensibilidad se mantuvo por debajo de 104 para Listerias totales y 0.6 ufc/g para la L.monocitogenes (Jackson et al, 1992).

#### Reacción enzimática en cadena con Inmunoensayo fluorescente

Los últimos avances en la detección rápida de patógenos en los alimentos fue introducida en 1992, es una versión de la tecnología ELISA que emplea medida fluorescente como indicador de reacción positiva. Con esta técnica se han ensayado sistemas de inmunodiagnóstico multiparamétrico para la detección directa de antígeno de Salmonella, Listeria, o enterotoxinas en los alimentos.

El sistema emplea un receptáculo de fase sólida, una pipeta revestida con anticuerpos en su superficie interior para ayudar a la captura del antígeno específico, además cuenta con un esquema especialmente diseñado para ello, conteniendo todos los reactivos predispensados que son requeridos para el contraste. A diferencia del protocolo de ELISA el Inmunocontraste fluorescente en cadena enzimática es completamente automatizado y no requiere ninguna manipulación manual (Vasavada, 1993).

#### Hibridación de los Ácidos Nucleicos

La técnica de hibridación de Ácidos Nucleicos (AN) puede ser empleada para detectar M.O patógenos de una forma rápidas 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 fue introducida por Fitts (1985), con este ensayo los resultados son obtenidos en un periodo 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 e isótopos radioactivos limita su uso en muchos laboratorios. Ensayos de hibridación de AN para Salmonella y Listeria que utilizan la detección enzimática y un punto terminal colorimétrico se han desarrollado en los últimos tiempos (Curiale et al, 1990).

En comparación del método de hibridación colorimétrico de DNA con los procedimientos convencionales para la detección de Salmonella en un total de 1000 muestras de alimentos, representando a 20 tipos diferentes donde se incluía la LDP, suero de queso liofilizado y leche achocolatada entre otros, se concluyó que el método de hibridación era tan efectivo como los métodos oficiales, llegándose a reconocer por estudios interlaboratorios como método oficial (Chan et al, 1990).

### PCR

El PCR es una técnica utilizada para amplificar un segmento de DNA que es franqueado por dos regiones de la frecuencia conocida. Es un protocolo 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 102 moléculas. El DNA amplificado es detectado mediante el uso de gel agarosa o una hibridación meridional empleando una prueba sexológica.

El PCR ha sido usado para la detección de bacterias patógenas como E. coli (Gooding y Choudary 1997), L. monocitógenos (Wernars et al, 1991), Microbacterium tuberculosis (Sjobring et al, 1990) y otros. Esta técnica ha sido una alternativa atractiva para la detección de bajas concentraciones de M.O patógenos (102 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 M.O que son muertos durante el procesamiento no son reconocidos como tales y si un DNA está presente lo dará como falsos positivos. Este problema puede ser resuelto mediante un corto paso de enriquecimiento previo a la extracción del DNA, no obstante constituye una atractiva técnica con posibilidades de ser utilizada en la microbiología láctea (Vasavada, 1993).

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

Un concepto completamente novedoso con posibilidades de extensión dentro del campo de la analítica de patógenos en alimentos es la enumeración rápida de M.O con fagos recombinantes con genes Lux. El principio 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 explicaciones 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 bacteriófagos, evaluación de la eficacia de antibióticos y otras sustancias con actividad antimicrobiana, así como en la predicción de la vida útil en anaquel (Baker et al, 1992).

### **CONCLUSIONES**

En sentido general los métodos rápidos expuestos presentan una serie de aspectos en común:

- a) fáciles de automatizar
- b) poseen una alta sensibilidad
- c) son métodos simples
- d) se pueden obtener lecturas no destructibles

Estos aspectos hacen de estos métodos una herramienta muy importante para ser usada en el trabajo de los laboratorios.

### **BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA**

1. Alffi, Lorna y Rumbado, Mabel. (revisado en el 2002). La contaminación. Disponible: <http://www.calidadalimentaria.net/contaminación.htm>
2. Anónimo (revisado en el 2004). Universidad de Córdoba. Servicios de análisis. Disponible: <http://www.uco.es>
3. Anónimo. (revisado en el 2005). Microbiología de Alimentos. Tema12. métodos generales de análisis microbiológicos de los alimentos II. Disponible: [http://www.unavearra.es/genmic/cursomicrobiologia\\_general.htm](http://www.unavearra.es/genmic/cursomicrobiologia_general.htm)
4. Anónimo. (revisado en el 2003). Detección de antibióticos e inhibidores en leche. Disponible: [http://www.insulab.es/página\\_zeu\\_inmunotec.htm](http://www.insulab.es/página_zeu_inmunotec.htm)
5. Bonachea, H. (2004). Métodos para el examen microbiológico. Microorganismos indicadores. Métodos convencionales y Métodos rápidos. Conferencia impartida en el curso Microbiología de los Alimentos, Laboratorio Nacional de Bromatología, Cdad. Habana.
6. Baker, J.M. Griffiths, M.W. Collin-Tohompson, D.L. (1992). Bacterial bioluminescence applications in food microbiology. *J.Food Prot.* 55:62.
7. Barcina, Y. Mora, M.T. Herrera, A. (1989). Métodos de detección rápida en microbiología de los alimentos. *Rev. Agroquim. Tecnol.Aliment.* 29 (2), pp149-161.
8. Baumgar, J. (1996). Quick methods and automation in food microbiology. *Fleischwirts chaft*, Vol 76. Iss 2, pp124.
9. Bishop, J.R (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.
10. Bred, R.S (1911). The determination of the number of bacteria in milk by direct microscopic examination. *Zentralblatt For Bakteriologic, Parasitenunde, Infektionskrankheiten and Higgiene*, Part II (IglI), 30:337-440.
11. Brodsky, M.H. Ceiben, B.W. (1980). Collaborative evaluation of the plate loop technique for determining viable bacterial counts in raw milk. *Journal of Milk and Food Protection*, 43, 287-291.
12. Castillo, A. (2004). Calidad e Inocuidad en Plantas Lecheras. Animal Science Department. Faculty of Food Science and Technology. Texas. University College Station TX 77843-2471.
13. Chan, S.W. Wilson, S.G. García, M.V. Whippie, K. Ottoviani, M. Whilby, A. Sahd, A. Johnson, A. Mozola, M.A. Halbert, D.N. (1990). Comparative studie of colorimetric DNA hibridation method and conventional culture procedures for detection of salmonellae in food. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 73:419.
14. Curriale, M.S. (1990). Colorimetric \_eoxyribonucleic acid hybridation assays for rapad screeing of salmonella in food. *J. Assoc. Offc. Anal. Chem.* 73:248.
15. Dassen, A. Olid, R.M. Grappin, R. (1992) Assesment of the Bactoscan for rapid and automatic enumeration of total flora in raw milk. *Lalt*, 71 (6):661-670.
16. Easter, M. C. (1989). Metabolic activity as a measure of microbiological evalualy. *Modern Microbiological Methods for Dairy Products. Proceeding of International Seminary in Stander Spain.* 202-229

17. Fitts, R. (1985). Development of DNA hybridization test for the presence of Salmonella in food. Food Technol. 39(3):94.
18. Flower, R.S. Klatt, M.J. (1998). Immunodiffusion screening method for detection of motile Salmonella in food. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72:303.
19. Fung, D.Y.C. (1994). Rapid methods and automation in food microbiology. A review. Food Reviews International 10:3, 357-375.
20. Gaida, D. Reroz, A. Verdier, B. Piton, C. (1990). Estimation de la flore du latí cru par microrespirometrie a presión et volume variables. Latí 72 (5).
21. Goldschmidt, M.C. (1991). Microbiological Instrumentation for the food industry: Rev. Rapid Methods in microbiology and Immunology. Pp512-519.
22. Gooding, C.M. Choudary, P.V. (1997). Rapid and sensitive emmunomagnetic separation polymerase chain reaction method for detection of Escherichia coli O157:1-17 In raw milk and ice.cream. J.Dairy-Res. 1997 Feb, 64(1):87-93.
23. Grappin, R. (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.
24. 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
25. 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).
26. June une, G.A. (1992). Comparison of two enzyme immunoassays for recovery of Salmonella spp from four low moisture foods. J. Food Prot. 51:53.
27. 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
28. 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.
29. Lück, H. Lategan, B. (1985). Calibration of Loops used for the plate Loop technique. South African Journal of Dairy Technology. 17:83-85.
30. Mardones F.R (1994) Importancia de la leche y sus productos lácteos en la salud nutricional humana. Libro Resumen: Memoria VI Congreso Panamericano de Lechería. Medellín. Colombia.
31. Moody, T.P. Donovan, M.A. Laue T.M. (1996). Turbidimetric studies of Limulus coagulant gel formation. Biophys, J. 71 (4).
32. Mottar, J.A. (1987) Colorimetric endotoxine assay for the determination of the bacteriological quality of milk. Netherland Milk and Dairy Journal. 41:137-145.33.
33. Ponce, P. (1989). Calidad de la leche y su control. Una problemática nacional. Laboratorio de Ensayos Estatales de Calidad de la Leche. CENSA:
34. Ponce, P. Armenteros, Mabelin (1999). Producción y calidad de la leche: Temas de actualización para técnicas de la lechería. 2 do Curso Internacional "Producción y Calidad de la Leche en el Trópico Americano"
35. 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.

36. Rodríguez, J.L. (1991). Study of the Bactoscan 8000 and its. Comparison with the agar plate counts method. *Alimentaria*. 22:33-38.
37. Rodríguez, E. (2001). Leche e inhibidores en leche. *Rev. Técnica Frisona internet*. Disponible: <http://www.frisona.com/web/tecnologia/articulos/art4.htm>
38. Scout, A.O. Robertson, A. (1995). Biosensor: A tool for the food and beverage industries. *Res Assoc. Symp.* 5 th july.
39. Suhren, G. Heeschen, W. (1991). Determination of pyruvate and other metabolites. *Bulletin of the IDF* 256/1991:37-40.
40. Sjobring, U. Mecklenburg, M. Andersen, A.B. Mioner, H. (1990). Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis. *J.Clin.Microbiol.*28 (10):2200.
41. Tejedor, R. (1998). Métodos rápidos de análisis microbiológico en alimentos. VI Conferencia Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 23-27 marzo. La Habana. Cuba.
42. Vasavada, P.C. (1993). Dairy microbiology and safety: Dairy Science and Technology Handbook. Volume 2. Product-Manufacturing. New York, NY USA VGH-Publishers pp 301-426.
43. Wernars, K. Heuvelman, C.J. Chakraborty, T. Nodtermans, S.H.W. (1991). Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J.Appi.Bacteriol.* 70-121.
44. White, C.H. (1998). Factores que afectan la vida de almacenamiento de los productos lácteos terminados. *Memorias del Congreso Panamericano de Mastitis y Calidad de la Leche*. México 23-27 marzo.

Trabajo recibido el 02/02/2006, nº de referencia 070603\_RED VET. Enviado por su autor principal.  
Publicado en [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](#), ISSN 1695-7504 el 01/07/06.

[Veterinaria.org®](#) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](#) - Veterinaria Organización S.L.®

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](#) –<http://www.veterinaria.org/> y [REDVET®](#)  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](#) 1996 -2006