

ESCASO VALOR DE LA PRUEBA DE AZUL DE METILENO EN EL CONTROL BACTERIOLOGICO DE LECHE CRUDAS

Dra. Nenúfar Sosa de Caruso ¹

Dora González ²

Dra. Anita Feder ³

Bach. D. Muñoz ⁴

180 muestras de leche cruda fueron analizadas al llegar a la planta procesadora. Se realizó la prueba de azul de metileno, Standard Plate Count, Coliformes, estimación de células (VWT) y presencia de antibióticos. Los resultados obtenidos mostraron poca sensibilidad en:

- leches con gran antagonismo microbiano e incremento de G. Coliforme.
- leches con alto contenido de células (infección mamaria).
- leches con antibióticos (terapia de mastitis).

1) Prof. Adj., encargada de la cátedra Tecnología de la Leche.

2) Ayudante de la cátedra Tecnología de la Leche.

3) Asistente de la cátedra Tecnología de la Leche.

4) Colaborador.

Creemos entonces, que este test de reducción no tiene valor como una prueba oficial para la categorización microbiológica de leches crudas llegadas a la planta en tales condiciones.

INTRODUCCION

En el Uruguay se consumen 400:000.000 de litros de leche líquida por año (60 %) de un total de producción estimado en 730:000.000 de litros anuales. Llega así a constituir uno de los 6 primeros países del mundo de mayor consumo de leche fluida por habitante, 140 lts/año. Es por ello que el control de calidad basado en la higiene a nivel de su producción y a la llegada a

la planta industrializadora ha merecido en todo momento la mayor atención de quienes deben velar por la salud del consumidor, fundamentalmente del veterinario higienista.

Sin embargo, aún no se ha logrado la categorización de la leche por su calidad bacteriológica, ni tampoco ha sido posible hasta el presente, llegar a una producción uniforme desde el punto de vista de su calidad higiénica a nivel del tambo. Sigue siendo motivo de estudios e investigaciones el desarrollo de una técnica rápida, sencilla y económica, sobre todo posible, capaz de reflejar el verdadero grado de higiene en el momento de la recepción. A tales efectos se han propuesto gran número de pruebas, siendo las de reducción de colorantes una de las más utilizadas como oficiales en los países de explotación y tecnología lechera avanzada.

El test de reducción del azul de metileno, empleado por primera vez en 1912 por Barthel y Orla-Jensen (1), cuyo principio se basa en la actividad metabólica de los microorganismos presentes en la leche, es empleada en Gran Bretaña desde el año 1937 como prueba oficial, con la modificación de Wilson (2) realizada en 1935.

Dice C. K. Johns, B. S. A. (3) que las bacterias difieren en su capacidad reductora y en su temperatura óptima de desarrollo, de ahí que la concordancia entre el tiempo de reducción y el N° de gérmenes viables sea tanto mayor cuanto más contaminada está la leche. SCHÖNHERR (4) dice que la prueba de reducción puede utilizarse para la valoración del contenido de gérmenes acidófilos, como una forma de conocer grado de frescura y conservación, por cuanto existe gran número de bacterias que sólo poseen escaso poder reductor o carecen de él (g. proteolíticos o coagulantes), mientras que otros como coliformes y ácido-lácticos lo poseen en alto grado. Demeter (5) cree, sin embargo, que antes que las bacterias como factores que influyen los resultados de las pruebas, están las sustancias disueltas en la leche que deben ser consumidas por las bacterias, así

como los sistemas propios de reducción (desdoblamiento de la proteína, caseína, etc.). De modo que, debido a la gran fuerza reductora de las bacterias ácido-lácticas, los métodos de reducción de colorantes constituyen más bien una prueba específica del estado de frescura y de la capacidad de conservación de la leche cruda, que para determinar el contenido general de gérmenes.

Terplan, G (6) manifiesta que por la actividad de los gérmenes presentes en la leche se consume el oxígeno disuelto disminuyendo el potencial redox de + 350, + 450 mvolts a - 185 mvolts. Como las diversas clases de gérmenes influyen de manera muy distinta sobre el potencial redox, las pruebas de reducción no permiten sacar ninguna conclusión exacta sobre el contenido microbiano.

Alais, Ch (8) dice que los leucocitos tienen una débil acción reductora en la leche normal; el pH influye sobre el potencial redox, (Eh), siendo el oxígeno disuelto el principal responsable del Eh positivo de la leche cruda fresca.

Las bacterias que proliferan en la leche tienen una actividad reductora como consecuencia de dos fenómenos: a) desaparición del oxígeno disuelto a causa del metabolismo desarrollado; b) producción de un sistema propio de las bacterias.

Harvey, C. Hill, H. (9) especifican que la leche que contiene un gran número de microorganismos productores de mastitis, no sufre decoloración, excepto en el caso de que se encuentren presentes además células de pus en gran número. La presencia de cualquier antibiótico en la leche, prolonga probablemente el período de reducción.

Rossi Lema, L., Echenique, L., y Caruso, N. S. de (10) destacan que muestras de leche con altos contenidos celulares leucocitarios generalmente actúan con una actividad desusada en los primeros momentos de observación de la prueba, por lo que se deduce que el test puede tener una variante de gran importancia desde el punto de vista del despistaje de leches con al-

tos contenidos celulares leucocitarios, obediendo a leches anormales o patológicas.

Sobre la base de estos trabajos, hemos estudiado en un total de 180 muestras de leche cruda llegada a la planta pasteurizadora, el comportamiento del test cuando es realizado con leches muy contaminadas, con altos recuentos leucocitarios y en presencia de antibióticos, tal como ocurre en nuestro medio, donde la explotación lechera en general no se ha desarrollado lo suficiente donde no existen programas de control sistemático de mastitis, ni tampoco está en vigencia el sistema de pago por mejor calidad de leche producida, que hace algunos años había sido implantado.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) PRUEBA DE REDUCCION DEL AZUL DE METILENO

Muestras de leche: Se obtienen en horas de la mañana, inmediatamente después de llegada la leche a la planta, luego de haber sido transportada en bidones de 30 litros por medio de camiones. En algunos casos y dependiendo de las distancias, transcurren varias horas de espera sobre la carretera, debiendo soportar especialmente en verano, temperaturas por encima de los 28-30°C. Este trabajo comenzó en el mes de mayo (invierno), finalizando en diciembre (verano). Las muestras fueron mantenidas durante 4 horas a + 5°C hasta el momento de comenzar las pruebas, teniendo en cuenta lo expresado anteriormente.

Técnica: Preparación de la solución de azul de metileno. — Se obtuvo la solución luego de disolver 1 tableta de 0,5 g de peso de Blauen Feldt y Tvede de Copenhague, conteniendo 9 mgs. de colorante, en 200 ml de agua destilada, hervida y fría en matraz estéril; de esta solución se llevó 1 ml a un tubo estéril que contenía 10 ml de leche, previamente homogeneizada durante 25 veces el agitado a mano. Luego fueron tapados los tubos con tapones de goma estériles e invertidos una o dos veces antes de la incubación en BM a 37°C, momento que se anotó con precisión.

La primera observación se hizo a los 20' durante la primera hora, y cada 30' du-

rante las horas restantes. Los tubos decolorados fueron retirados anotando el tiempo.

La decoloración sufrida por el azul de metileno al pasar del color azul al blanco se explica hoy, de acuerdo con la teoría de la deshidrogenación de Wieland, sobre el transporte metabólico, resultando reducidos simultáneamente la sustancia agregada (colorante) así como los receptores naturales de H₂, mientras que en otros tiempos se admitía que los componentes de la leche provocaban la reducción, una vez fijadas las valencias ácidas existentes en ellos, por las bacterias.

2) NUMERACION DE GERMENES AEROBIOS VIABLES MESOFILOS

La técnica comprende en primer término el agitado de la muestra durante 25 veces consecutivas, luego se realizan las diluciones decimales de 10⁻¹ a 10⁻⁵. Se colocan luego en tubos que contienen 9 ml de diluyente, en este caso, solución salina peptonada, 1 ml de dilución. El inóculo de 1 ml de la muestra problema y 1 ml de las diferentes diluciones fueron sembrados en cajas de Petri. Fue agregado el medio de cultivo (PCA, DIFCO) en cantidad de 10 a 15 ml previamente fundido y enfriado a 45°C. Luego de solidificado el medio se incubaron a 37°C durante 48 horas. El recuento se realizó en las cajas que contenían entre 30 y 300 colonias de las distintas diluciones.

3) NUMERACION DE COLIFORMES

La técnica seguida es la misma que para el recuento de gérmenes aerobios mesófilos, siendo el medio selectivo en este caso el V.R.B.A., o sea, la gelosa lactosada con bilis, violeta de genciana y rojo neutro. Se contaron las colonias rojas de 0,5 a 1 mm de diámetro como correspondiente a Coliformes. La incubación se realizó a 37°C durante 24 hs.

4) NUMERACION INDIRECTA DEL CONTENIDO CELULAR (WISCONSIN MASTITIS TEST)

Seleccionamos esta técnica para la estimación indirecta del número de células (leucocitos) porque nos permitió realizar un número grande de muestras por unidad

de tiempo y además por su mayor exactitud frente a leches de pequeña y gran mezcla como lo constituían estas que analizamos.

Técnica. — Se pipetearon 2 ml de leche previamente homogeneizada con jeringa automática en los tubos especiales del equipo. Luego mediante pipeteo continuo, se agregaron 2 ml de reactivo WMT por debajo de la superficie de la leche en cada tubo. Se taparon los tubos y se procedió a mezclar leche y reactivo por suave balanceo de la gradilla durante 10 segundos. Luego se completó la mezcla leche-reactivo durante 20 segundos y se procedió a invertir el soporte, que colocado en forma vertical permite que la mezcla leche-reactivo deslice a través de los tapones, que están previamente horadados y calibrados, durante 15 segundos. Luego se retornó el soporte a su posición inicial durante 2 ó 3 minutos y posteriormente se procedió a la lectura midiéndose la columna fluida que permaneció en cada tubo, mediante una regla especialmente calibrada.

El WMT en sus resultados se corresponde con el conteo directo de células al microscopio (el coeficiente de la relación es 0,9). El coeficiente de variación es del 9%. Una lectura del WMT de 20, puede ser interpretada como detectando leches que contienen más de 500.000 células por ml.

5) DETECCION DE ANTIBIOTICOS (TECNICA DE GALESLOOT)

Técnica: Se procedió a sembrar en caja de Petri 1 ml del cultivo de *Bacillus stearothermophilus* var *caleidolactis*; se agregó el medio de cultivo (triptona-agar-extracto de levaduras) previamente fundido y homogeneizado, a una temperatura de 50°C. Solidificado el medio, se impregnaron discos con las diferentes muestras examinadas, y se colocaron mediante pinza estéril sobre el medio, ejerciendo leve presión, y en condiciones asépticas. Se colocó un disco impregnado en una solución que contenía 0,05 U.I. de penicilina. Las cajas se incubaron a 55°C durante 2 a 6 hs.

El método de los discos se basa en la difusión del antibiótico en el medio geloso donde sembramos el *B. Stearothermophilus* var *caleidolactis* como microorganismo test sensible a la mayor parte de los antibióticos. En este caso nos limitamos a detectar presencia de antibiótico por comparación con un disco de leche testigo (sin antibiótico) y un disco conteniendo 0.05 U.I. de penicilina.

DISCUSIÓN

Si bien las muestras de leche cruda fueron enfriadas previamente a los análisis, durante 4 horas a +5°C, no fueron preincubadas como aconseja MORGES y AUCLAIR (11), en cuyo caso las cargas microbianas hubieran sido quizás menores. Sin embargo, las bacterias de contaminación, pueden según estos autores estar presentes en gran número tanto en las leches refrigeradas como en las que no lo están, determinando que cuanto mayor sea el tiempo de refrigeración a bajas temperaturas (+4°), más prolongadas serán los tiempos de reducción del colorante. Este hecho valoriza la interpretación de la prueba, aunque no siempre a favor de una mejor calidad bacteriológica.

Después de PANES y THOMAS (13) coincidimos que en las leches crudas refrigeradas, microorganismos del grupo Coliforme son capaces de multiplicarse activamente aún a temperaturas cercanas a 0°C. Estas variedades psicrótrofas fueron encontradas según los autores en el 35% de las leches crudas refrigeradas.

Las leches que decoloraron aun en los plazos mínimos comprendidos entre 20' y 1 hora, acusan recuentos microbianos menores de 3×10^8 gérmenes/ml. Destacamos que estas cifras corresponden precisamente a Coliformes, grupo que a consecuencia de los fenómenos de antagonismo bacteriano llega a ser predominante en un 17,2% de muestras analizadas. (Ver cuadro I). Sólo en un 6,6% las lecturas fueron "incontables", tanto para SPC (Standard Plate Count) como para Coliformes con resultados negativos en presencia de antibióticos (PA) así como un recuento indirecto de células por el método WISCONSIN MASTITIS TEST (WMT).

RESULTADOS

CUADRO I

AM	PA	WMT	SPC	Coliformes	Nº muestras	%
DT = < 1 hora	NEG	< 75.000	> 10 ⁶	> 2 x 10 ⁶	31	17,2
	NEG	NEG	incontable	incontable	12	6,6
TOTAL					43	23,8 %

CUADRO II

AM	PA	WMT	SPC	Coliformes	Nº muestras	%
DT = 2 a 4 hs.	NEG	NEG	500.000 a 2 x 10 ⁶	< 10 ⁴	77	42,7 %

CUADRO III

AM	PA	WMT	SPC	Coliformes	Nº muestras	%
DT = > 5 hs.	+	> 500.000	500.000 a 2 x 10 ⁶	< 10 ³	15	8,3 } total: 11,7 % 3,4
	+	< 10 ⁶	< 50.000	< 10 ³	6	
	NEG	< 75.000	< 200.000	< 10 ²	39	21,6
TOTAL					60	33,3 %

Total de muestras conteniendo antibióticos y alto contenido celular en forma concordante.... 21 ... 11,6 %
Total de muestras con recuentos microbianos altos; predominio de G. Coliforme..... 43 ... 23,8 %
Total de muestras rechazadas..... 64 ... 35,4 %
Total de muestras de la. calidad (Categoría I)... 39 ... 21,6 %
Total de muestras aceptables (Categoría II) de calidad mercantil..... 77 ... 42,7 %

Al observar el cuadro II, reunimos el mayor porcentaje de muestras analizadas (42,7 %) que sufrieron DT de la prueba AM en el plazo de 2 a 4 horas, oscilando el contenido microbiano entre 500.000 g/ml a 2 x 10⁶ (SPC), mientras que para Coliformes obtuvimos una cifra menor de 10⁴/ml y resultados negativos en P.A. A nuestro criterio son leches de calidad mercantil **ACEPTABLE** desde este punto de vista, dado que la pasteurización influye favorablemente en la conservación y prolongación de su vida útil, cumpliendo simplemente

con una finalidad comercial. No nos resultan aceptables en cambio por su contenido microbiano, coincidiendo con la categorización establecida por Barthel y Jensen (5) sobre la base del método de Breed y Brew (12) debiendo admitir que tan sólo son leches de calidad bacteriológica **REGULAR**.

Para proceder a la categorización basada en la calidad bacteriológica de un alimento, debemos juzgar al mismo con criterio higienista y no empresarial, admitiendo sólo como leches de primera calidad (Categoría I) aquellas que no sufren DT entre 5 a 8 hs.

Observando el cuadro III, encontramos un porcentaje del 33,3 que decoloraron el AM en más de 5 horas, lo que nos hace pensar en leches de primera calidad bacteriológica. Si nos detenemos en los resultados de SPC, PA y WMT, vemos que el 11,6 % corresponde a leches con altos recuentos celulares de más de 500.000 cél/ml, en estrecha concordancia con la presencia de antibióticos (PA). Un 3,4 % presenta contenido microbiano inferior a 50.000 g/ml, coincidiendo sin embargo con los recuentos más altos en elementos celulares, menor de 10^6 .

Se obtiene solamente un 21,6 % de leches que podemos calificar de 1ª, CALIDAD BACTERIOLOGICA por:

- 1) ausencia de antibióticos,
- 2) contenido microbiano menor de 2×10^5 ,
- 3) contenido celular menor de 75.000 cél/ml.

Se evidencia aquí en forma clara, una acción sinérgica de la hiperleucocitosis láctea por un lado y la presencia de antibióticos por otro, retardando los resultados de la prueba AM. Este hecho, independientemente del plazo de reducción del colorante, nos induce a aceptar leches patológicas como de 1ª calidad, seguramente procedentes de ubres con procesos inflamatorios agudos y en períodos de tratamiento con antibióticos. Según los Trabajos de Rossi Lema, L., y Gil Tournes, C. (14) nuestra cuenca lechera tiene una incidencia de mastopatías del 68,5 % (mastitis subclínicas), de las que un 29,7 % estaban dadas por m. estafilocócicas.

Agrava esto la inexistencia hasta el presente de un Programa de Control Sistemático de Mastitis, que además del tratamiento y profilaxis adecuada, regule el uso de antibióticos que en la mayoría de los casos son prescritos por el propio productor. Tampoco existe en la actualidad la prohibición del envío de la leche a la usina, proveniente de vacas en tratamiento.

CONCLUSIONES

La prueba de reducción de AM constituye por sí sola en muchos países una

prueba oficial de categorización de las leches crudas.

Hemos demostrado a través del presente trabajo, que sólo podemos adjudicarle el valor que la mayor parte de los autores ha pretendido darle, siempre que los tiempos de reducción puedan estar avalados por:

1. recuento indirecto de células (aumento de polimorfonucleares) — WMT—,
2. numeración de gérmenes, específicamente del grupo Coliforme,
3. ausencia de antibióticos.

En las leches refrigeradas o no, en las que siempre este grupo predomine, la reacción se intensifica presuponiendo deficiencias higiénicas en el manejo del tambo, enfriado y transporte.

Hemos podido establecer que la leche en estas condiciones constituye un alimento potencialmente peligroso en nuestro medio.

La pasteurización como proceso térmico no disminuye este riesgo, dada la termoresistencia de ciertas toxinas y residuos de antibióticos.

En leches obtenidas en nuestro país y quizá en muchos otros en subdesarrollo, no podemos adjudicar a esta prueba el valor que tiene como orientación para juzgar la calidad bacteriológica de leches crudas.

Como higienistas nos importa:

1. detectar la presencia de antibióticos (PA) que no serán destruidos por los procesos térmicos,
2. Conocer en forma estimativa el aumento celular, que unido a PA puede indicar fácilmente leches patológicas, y
3. numeración de gérmenes coliformes como indicadores de higiene deficiente.

Sólo de esta manera se logrará la aplicación de un sistema de precio estímulo por calidad bacteriológica, vigente en muchos países (en el nuestro en desuso) que beneficie al productor de leche de mejor calidad y no al que produce leche enferma.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— Barthel, Orla-Jensen: *Milchw. Zbl.*, 41, 417-429, 1912.
- 2.— Rossel Dos Santos, S. M.: *Métodos Analíticos de Laboratorio Lactológico y Microbiología de las Industrias Lácticas*. Tomos I y II. Ed. Acribia, España, 1952.
- 3.— Johns, C. K.: *Higiene de la leche*. Serie de Monografías, FAO/OMS N° 48, págs. 244-247, 1966.
- 4.— Schonherr, W.: *Análisis de la leche*, Ed. Acribia, España, 83, 1959.
- 5.— Demeter, K. S.: *Lactobacteriología*. Ed. Acribia, España, 80-73, 1969.
- 6.— Terplan, G., Lerche, M.: *Inspección Veterinaria de la Leche*, Ed. Acribia, España, 229, 1969.
- 7.— Caruso, N. S. de, Feder, A.: *Análisis y control de la leche y derivados*. Facultad de Veterinaria de Montevideo, R. O. Uruguay. 1971. Asociación Uruguaya de Veterinaria para la Higiene de los Alimentos AUdeVHA).
- 8.— Alais, Ch.: *Ciencia de la Leche*. CECSA, España. 407, 1971.
- 9.— Harvey, C. W., Hill, H.: *Leche, Producción y Control*. Ed. Academia. España. 468, 1969.
- 10.— Rossi Lema, L., Echenique, L. y Caruso, N. S. de: *Resezurina, Azul de metileno, y contaje en placas en el control del contenido bacteriano de la leche higiénica*. Anales de la Facultad de Vet. Tomo VIII, N° 6, 1959, Montevideo, Uruguay.
- 11.— Mourges, R. et Auclair, J.: *Industrie Laitiere*, 201, 1964.
- 12.— Orla-Jansen: *Rév. Génér. du Lait*. 7, Núm. 13, 1909.
- 13.— Panes, J. J. et Thomas, S. B.: *J. Appl. Bact.* 22, 272, 1959.
- 14.— Rossi Lema, L. y Gil Tournes, C.: *Mastitis subclínicas*. Anales de la Facultad de Veterinaria. Tomo XII, N° 1, 11-20. 1970, Montevideo, Uruguay.
- 15.— Thompson, D. I. and Postle, D. S.: *The Wisconsin Mastitis Test, and Indirect Estimation of leucocytes in milk*. *Journal of Milk and Food Technology*. Vol. 27. N° 9. Sep. 1964.
- 16.— Galesloot, E., Håssing, H.: *Neth Milk Dairy J.*, 16-2, 89. 1962.
- 17.— Foster, Nelson, Speck, Doetsch, Olson: *Microbiología de la leche (1957)*. Ed. Herrero. 127, 1957.

RESUMEN

180 muestras de leche cruda fueron analizadas al llegar a la planta procesadora. Se realizó la prueba de azul de metileno, Standard Plate Count, Coliformes, estimación de células (WMT) y presencia de antibióticos. Los resultados obtenidos mostraron poca sensibilidad en:

- leches con gran antagonismo microbiano, predominio del grupo Coliforme,
- leches con alto contenido de células (infección mamaria),
- leche con antibióticos (terapia de mastitis).

Creemos entonces, que este test de reducción no tiene valor como una prueba oficial para la categorización microbiológica de leches crudas llegadas a la planta en tales condiciones.

SUMMARY

180 samples of raw milk were tested just arrived to the processing plant, with the Methylen blue-test, standard plate count, coliform group, cell estimation (WMT) and presence of antibiotics. The results obtained show little sensibility in:

- milks with great microbiological antagonism, increasing Coliform, group,
- milks with high contents of cells (udder infection),
- milks with antibiotics (mastitis therapy).

We believe then, that this reduction test would not have value as an official test for the microbiological categorization of raw milk arrived to the plant in such conditions.