

## ARTÍCULO

## Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada expendida en el estado Carabobo, Venezuela

Teresita Luigi<sup>1,3</sup>, Legna Rojas<sup>2</sup>, Oscar Valbuena<sup>2,3</sup>.

### RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada proveniente de diversas zonas del estado Carabobo, Venezuela. Siguiendo la metodología descrita por la APHA y COVENIN, fueron analizadas 100 muestras de leche pasteurizada y 40 de leche cruda. En leche pasteurizada fueron determinados recuentos de: bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, termotolerantes (fecales), mohos y levaduras, en leche cruda sólo se realizaron recuentos de bacterias aerobias mesófilas y la prueba del tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM). Se investigó también la presencia de *Salmonella* spp. Los resultados de la leche pasteurizada, indican que 92% de las muestras cumplieron con los límites para bacterias aerobias mesófilas establecidos en la norma COVENIN. En relación a coliformes totales, 45% de las muestras se encontraron por encima del límite permitido en la Norma y 72% de las mismas excedía el límite de aceptación para coliformes termotolerantes. No se detectó presencia de *Salmonella* spp. En cuanto a la leche cruda, 72,5% de las muestras presentaron recuentos de bacterias aerobias mesófilas por encima de los límites establecidos, contrario a los resultados del TRAM, según los cuales sólo 30% de las muestras incumplían la norma. Los resultados demostraron que es necesario que las autoridades de salud del país implementen medidas más estrictas en el control sanitario de la leche, desde las fincas de ordeño hasta la industria láctea regional, ya que la elevada microbiota en leche cruda y altos recuentos de coliformes totales y termotolerantes en leche pasteurizada, además de disminuir la vida útil de la leche, podrían representar un riesgo potencial a la salud del consumidor.

**Palabras clave:** Leche, bacterias *Salmonella* spp., calidad microbiológica.

### ABSTRACT

#### Evaluation of the hygienic-sanitary quality of raw and pasteurized milk from Carabobo, Venezuela

In the present study the hygienic-sanitary quality of raw and pasteurized milk from various areas of the State of Carabobo, Venezuela, was assessed. Following the methodology described by the APHA and COVENIN, 100 pasteurized milk samples and 40 raw milk samples were analyzed. Counts of aerobic mesophilic

bacteria, total coliforms, thermotolerant (faecal) coliforms, molds and yeasts were determined for pasteurized milk; for raw milk, only counts of mesophilic aerobic bacteria and methylene blue reduction test (MBRT) were carried out. The presence of *Salmonella* spp. was also investigated. Test results of pasteurized milk indicated that 92% of samples met the limits set for mesophilic aerobic bacteria established by COVENIN; however, 45% of samples were above the limit allowed in the Standard for total coliforms, and 72% of them exceeded the limit of acceptance in terms of thermotolerant coliforms; *Salmonella* spp. was not observed. With regard to raw milk, 72.5% of the samples had aerobic mesophilic bacteria counts above the limits, contrary to the MBRT results, which claimed that only 30% of samples did not comply with the norm. These findings strongly suggest the need for the country's health authorities to implement more stringent sanitary control measures on milk from dairy farms and on the regional dairy industry, since the high microbiota found in raw milk and high counts of total coliforms and thermotolerant in pasteurized milk, in addition to diminishing the milk lifetime, could represent a potential risk to the consumer's health.

**Key words:** Milk, bacteria, *Salmonella* spp., microbiological quality

### INTRODUCCIÓN

El consumo de leche en las diferentes sociedades data de épocas muy remotas, antes de la era Cristiana, según diferentes fuentes. Este producto juega un papel de singular importancia en la nutrición humana, por considerarse un alimento casi completo y de sustento de diferentes procesos vitales y por constituir la materia prima de una gran variedad de productos (1). En Venezuela, la norma 903 de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) define la leche cruda como el producto íntegro, normal y fresco obtenido del ordeño higiénico e ininterrumpido de vacas sanas (2). Asimismo, COVENIN establece que la leche pasteurizada es la leche cruda homogeneizada o no, que ha sido sometida a un proceso térmico aprobado por la autoridad competente, en condiciones tales que garanticen la destrucción de microorganismos patógenos y la casi totalidad de los microorganismos banales que pudiesen estar presentes, sin que alteren sensiblemente las características organolépticas y fisicoquímicas de la misma (3). La leche pasteurizada, por ser un producto de origen animal además de rico en diversos nutrientes, puede contaminarse con un amplio espectro de microorganismos provenientes de diferentes fuentes; algunos causan sólo alteraciones en las características organolépticas de la leche (4); sin embargo, se pueden encontrar bacterias patógenas cuando ocurren fallas en el proceso térmico, cuando la leche cruda tiene una población exagerada de microorganismos incrementándose el margen de supervivencia y por contaminación post pasteurización (1). El problema radica en que los patógenos en leche pasteurizada son capaces de persistir sin causar

<sup>1</sup> Laboratorio de Prácticas Profesionales de Bacteriología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Cs de la Salud. Universidad de Carabobo. Venezuela

<sup>2</sup> Dpto de Biología. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad de Carabobo. Venezuela

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones de Microbiología Ambiental. Universidad de Carabobo

**Correspondencia:** Teresita Luigi

**E-mail:** teresitaluigi@hotmail.com

**Recibido:** Abril 2012

**Aprobado:** Diciembre 2012

alteración organoléptica alguna, con lo que aumenta el riesgo sanitario, ya que el consumidor no puede sospechar su presencia (4). Aunque la pasteurización, o tratamiento por calor de la leche, ha contribuido al dramático descenso de muchas de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), los brotes infecciosos asociados a leche pasteurizada han continuado ocurriendo.

En cuanto a la ocurrencia de ETA en América Latina y el Caribe, la mayor parte de las enfermedades de origen alimentario pueden atribuirse al mal manejo de los alimentos durante la preparación (5). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia anual de diarrea estimada en el mundo es de 1500 millones de casos, con una mortalidad anual de 3 millones de niños por debajo de los cinco años de edad. Se conoce que 70% de las diarreas se originan por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos y/o sus toxinas (6). En los Estados Unidos, se estimó que en el año 2011 ocurrieron 9,4 millones de episodios ETA, lo cual resultó en 55.961 hospitalizaciones y 1.351 muertes (7). La diseminación de estas enfermedades se ha relacionado principalmente con el consumo de alimentos de origen animal, como carnes y productos lácteos, entre otros (8). Los productos lácteos representan un importante vehículo de ETA en el mundo; de hecho, la contaminación post-pasteurización, la manipulación durante el proceso de fabricación, el equipamiento y el abuso de las condiciones de temperaturas durante el transporte y almacenamiento puede resultar en altos niveles de microorganismos patógenos en productos como el queso y otros productos lácteos (9). Entre los agentes etiológicos transmitidos por leche y productos lácteos que comúnmente pueden causar intoxicación, toxiinfección o infección alimentaria se encuentran miembros del género *Salmonella*. Se han descrito brotes por miembros de este género en distintos países, entre ellos, se destacan aquellos ocurridos en varios estados de Estados Unidos ocasionados por cepas resistentes de *S. typhimurium* vinculados a la leche pasteurizada (8). Otros brotes incluyen microorganismos como *E. coli* O157: H7 y *Yersinia enterocolitica* en el Reino Unido en los cuales estuvieron implicados botellas y cartones de leche pasteurizada de un local de productos lácteos (10). También se destacan casos de intoxicación estafilocócica (11).

En relación a lo descrito anteriormente, dado que las fallas en la pasteurización son poco frecuentes como causas de brotes infecciosos y que la contaminación ocurre después de la misma, algunos investigadores han recomendado enfatizar mecanismos reguladores adicionales en un monitoreo post-pasteurización de la leche (5). Sin embargo, también es importante la calidad microbiológica de la leche cruda como materia prima ya que una elevada carga microbiana podría interferir en su transformación tecnológica (1).

Prieto et al (12) indican que todos los sectores que intervienen en cualquier área de los alimentos, productores e industriales, se deben concientizar de que los productos derivados nunca serán de mejor calidad que la materia prima de la que procede. En relación con la afirmación previa, Díaz señala que cuando la leche cruda es de mala calidad, no se podrá obtener ningún derivado de buena calidad (1). En Venezuela, hay desconocimiento de la calidad sanitaria de

alimentos expendidos al público en general; son escasas las cifras oficiales de reportes donde se analice este aspecto que repercute directamente en la salud de la comunidad, e inclusive, en la economía del país. Por lo tanto, se hace indispensable una evaluación adecuada de productos de consumo masivo como la leche, con el propósito, como indica Valbuena et al (4), de plantear medidas correctivas en beneficio de la salud pública. Teniendo en cuenta la relevancia de lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada proveniente de distintos municipios del estado Carabobo, Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestra:** Estuvo constituida por 100 muestras de leche completa pasteurizada de una misma marca, obtenidas en 20 diferentes expendios comerciales del municipio Valencia (abastos, panaderías y supermercados), en cada local se muestrearon por día 5 unidades muestras del producto. Se analizaron también 40 muestras de leche cruda extraída mediante ordeño manual matutino, 30 de ellas provenientes de una receptoría de leche ubicada en el sector Urama del municipio Juan José Mora y 10 provenientes de una pequeña finca productora de queso artesanal, ubicada en el municipio San Diego del estado Carabobo.

**Recolección de las muestras.** Las muestras de leche completa pasteurizada fueron recolectadas mediante muestreo probabilístico de tipo aleatorio simple. Las muestras de leche cruda se colectaron de cántaras con capacidad de 36 litros usando un cucharón estéril y vertiendo la muestra en frascos de vidrio con tapa, estériles, con capacidad de 500 mL. Las muestras se colectaron dentro de la primera media hora posterior al ordeño manual matutino. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio en recipientes isotérmicos con hielo para reducir al mínimo los posibles cambios microbiológicos durante el transporte y almacenamiento de las muestras. Éstas se conservaron a temperatura de refrigeración (4 °C) por un lapso no mayor de 24 horas. En general, la toma de muestra se rigió por las normas de recolección de muestras de la Norma Venezolana COVENIN 938 de Leche y Productos Lácteos. Métodos para la toma de muestras (1ª Revisión) (13). Es de hacer mención, que las muestras de leche pasteurizada tenían fecha de elaboración reciente al momento de la toma de muestra; se excluían las muestras con fechas cercanas a la indicada para la culminación de su vida útil. La recolección y procesamiento de muestras se efectuó en un período de 4 meses continuos.

**Determinación de Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM) (Recuento en placa).** Según metodología estándar sugerida por COVENIN (14) preparando diluciones seriadas (1:10 hasta 1: 10.000) sembradas en placas con agar cuenta estándar (BBL™ Becton Dickinson and Company. Sparks, MD USA) a 32 °C por 48 horas. Las colonias se enumeraron al término del tiempo de incubación, en cuenta colonias tipo Quebec; se determinó el número de colonias presentes, considerando para el recuento únicamente las placas que tenían entre 25 y 250 colonias. El resultado expresado corresponde al número de microorganismos o unidades formadoras de colonias por mililitro de leche (15).

**Determinación de Mohos y Levaduras.** Según metodología estándar de siembra en profundidad sugerida por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA, según siglas en inglés) (15), empleando como medio de cultivo Sabouraud Dextrosa (BBL™ Becton Dickinson and Company, Sparks, MD USA) con antibiótico (cloranfenicol 0,4 g/L). Las muestras fueron dejadas a temperatura ambiente (25 a 29 °C) por 5 días. Para el recuento se seleccionaron las placas que tenían entre 10 y 100 colonias.

**Determinación de Coliformes Totales y Termotolerantes (fecales).** Para la determinación de coliformes se empleó el método de recuento de bacterias coliformes en placas de Petri mediante siembra en profundidad en Agar MacConkey (BBL™ Becton Dickinson and Company, Sparks, MD USA) y Agar Bilis Rojo Violeta (HIMEDIA®, Himedia laboratories, Mumbai, India), por duplicado, con posterior incubación a 37 °C y a 44 °C por 24 horas (según metodología estándar sugerida por la APHA) (15). Las colonias que resultaron sospechosas de coliformes termotolerantes o fecales, fueron tipificadas bioquímicamente por método convencional empleando las siguientes pruebas: Agar Hierro triple azúcar (TSI), Agar Lisina hierro (LIA), Urea, Malonato, Citrato, MIO (motilidad- indol-ornitina).

Para los recuentos de todos los indicadores de calidad sanitaria antes descritos, las siembras de las diluciones seriadas de las muestras se realizaron por duplicado, tomándose como resultado el número promedio de colonias de las dos placas de una misma dilución multiplicado por la dilución correspondiente.

**Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM).** Para la realización de la misma se siguió la metodología sugerida por la Norma COVENIN 939 (16). Para tal fin, se emplearon tantos tubos de ensayo estériles como muestras se analizaran; en cada tubo se agregó 1 mL de solución de azul de metileno y 10 mL de muestra de leche cruda. Se colocó a cada tubo una tapa de rosca; se invirtieron tres veces suavemente, y se incubaron en baño de agua a una temperatura de 36-37 °C (la muestra alcanza esta temperatura en un lapso no mayor de 10 minutos). La primera lectura se realizó a los 30 minutos. Si durante este período se decoloraba la muestra, se anotaba la lectura como TRAM 30 minutos, procediendo a retirar dicha muestra del baño de agua. En caso de persistir el color azul “celeste”, las lecturas subsiguientes se realizaban a intervalos de una hora. Al realizar cada lectura, si no había iniciado la decoloración, el tubo se invertía una vez y se colocaba de nuevo al baño de agua. Si había comenzado la decoloración se dejaba el tubo en el baño de agua sin moverlo.

**Detección de *Salmonella*.** La detección de *Salmonella* fue realizada según la metodología descrita por COVENIN 1291 (17). Se desarrollaron tres etapas: Un Pre-enriquecimiento, en 225 mL de agua peptonada al 0,1% donde se vertieron 25 mL de la muestra de leche pasteurizada, obteniendo una dilución 1:10; posteriormente se incubó a 37 °C por 24 horas. Transcurridas las 24 horas del pre-enriquecimiento,

se inició la etapa de enriquecimiento selectivo, para la cual se tomó 1 mL de la dilución de la muestra pre-enriquecida y se inoculó por separado en tubos contentivos de 10 mL de Caldo Selenito-Cistina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y Tetracionato (BBL™ Becton Dickinson and Company, Sparks, MD USA). Este último procedimiento se realizó por duplicado, incubando uno de los tubos a 37 °C y el otro a 44 °C por 24 horas.

**Enriquecimiento diferencial.** Las muestras provenientes de los caldos Selenito-Cistina y Tetracionato se sembraron por agotamiento, tomando una asada de cada tubo (37 °C y 44 °C), en placas de Petri con Agar MacConkey, Agar Xilosa- Lisina-Desoxicolato (XLD) y Agar *Salmonella-Shigella* (SS) (BBL™ Becton Dickinson and Company, Sparks, MD USA) respectivamente. De esta manera, se dispusieron de seis placas por cada muestra, las cuales fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente se seleccionaron 2 a 5 colonias sospechosas de *Salmonella*, para la caracterización fenotípica mediante el empleo del sistema automatizado API Lab Plus (Biomeriux).

**Análisis de los Resultados:** Para un mejor análisis e interpretación de los resultados, los datos obtenidos fueron tabulados y sometidos a estadística descriptiva, empleando un análisis de frecuencia (absoluta y relativa), reportándose la distribución porcentual según los indicadores de calidad sanitaria evaluados. Para los recuentos se calcularon los valores medios, máximo y mínimo de cada grupo (18).

## RESULTADOS

### Calidad sanitaria de la leche pasteurizada evaluada.

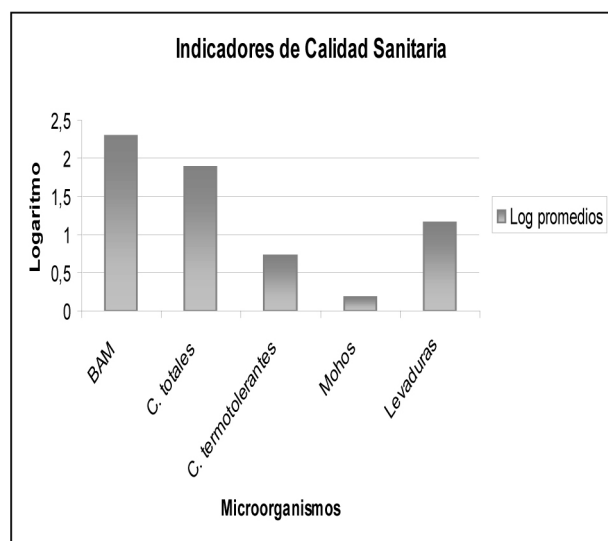
En el presente estudio se realizó un análisis de la calidad microbiológica de 100 muestras de leche pasteurizada. Para tal fin se evaluaron los microorganismos indicadores de calidad sanitaria (bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, termotolerantes o fecales y hongos (mohos y levaduras), según la metodología clásica o convencional sugerida en Venezuela por las normas COVENIN y cuya presencia o ausencia en los productos alimenticios ponen en evidencia indirectamente las condiciones higiénicas bajo las cuales han sido manejados o manipulados. En la tabla 1 se puede apreciar que la carga de bacterias aerobias mesófilas determinada estuvo entre  $1,0 \times 10^5$  y  $7,0 \times 10^5$  unidades formadoras de colonia por mililitro de leche (UFC/mL) con una media global de  $1,8 \times 10^4$  UFC/mL. También se observa que para coliformes totales el recuento promedio fue de  $2,6 \times 10^3$  UFC/mL con un intervalo que osciló entre  $1,0 \times 10^5$  y  $8,0 \times 10^4$  UFC/mL. En relación al recuento de coliformes termotolerantes o fecales, se presenta un valor promedio de  $0,7 \times 10^7$  (7 UFC/mL) y un intervalo entre  $0,1 \times 10^5$  y  $2,0 \times 10^7$  UFC/mL. La media al cuantificar la presencia de mohos fue de  $0,2 \times 10^4$  UFC/mL con un recuento entre  $0,1 \times 10^5$  y  $0,9 \times 10^4$  UFC/mL y para las levaduras el valor fue de  $1,3 \times 10^2$  UFC/mL con un intervalo de  $1,0 \times 10^1$  a  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL. Es importante mencionar que no se detectó presencia de *Salmonella* en el 100% (n=100) de las muestras de leche pasteurizada analizadas.

**Tabla 1.** Indicadores de Calidad Sanitaria (COVENIN 798:1994) y detección de *Salmonella* (COVENIN 1291-2004)

INDICADORES DE CALIDAD SANITARIA		RECUENTOS PROMEDIOS (UFC/ML)			INTERVALO (UFC/mL)
		UFC/mL	M (UFC/mL)	Log	
RUTINA	BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS (BAM)	1,8 x 10 <sup>4</sup>	2 x 10 <sup>4</sup>	2,297	1,0 x 10 - 7,0 x 10 <sup>5</sup>
	COLIFORMES TOTALES	2,6 x 10 <sup>3</sup>	1 x 10 <sup>2</sup>	1,895	1,0 x 10 - 8,0 x 10 <sup>4</sup>
	COLIFORMES TERMOTOLERANTES	0,7 x 10	0,3 x 10	0,734	0,1 x 10 - 2,0 x 10
ESPECIALES	MOHOS	0,2 x 10	1 x 10 <sup>2</sup>	0,189	0,1 x 10 - 0,9 x 10
	LEVADURAS	1,3 x 10 <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>2</sup>	1,154	1,0 x 10 - 1,0 x 10 <sup>4</sup>
	<b>SALMONELLA / 25 mL de muestra</b>	<b>AUSENTE EN 100% DE LAS MUESTRAS</b>			

**M** = Recuento máximo permitido según Norma COVENIN 798:94

**UFC/mL** = Unidades formadoras de colonias por mililitro de leche pasteurizada.

**Figura 1.** Indicadores de Calidad Sanitaria (COVENIN 798:1994)

En la figura 1 se presentan los recuentos promedios obtenidos para los indicadores de calidad sanitaria, expresados en logaritmo, siendo para las bacterias aerobias mesófilas igual a 2,297, para coliformes totales y fecales una media logarítmica de 1,895 y 0,734 respectivamente. También se observa gráficamente la media al cuantificar la presencia de hongos la cual fue de 0,189 para mohos y un valor de 1,154 para levaduras.

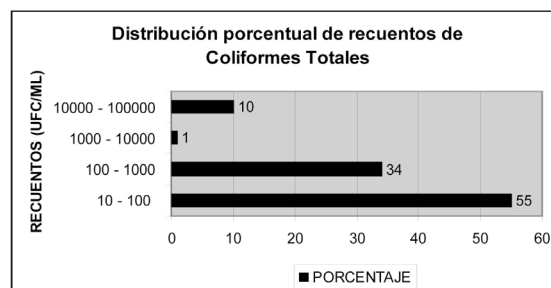
En la Tabla 2 se muestra la distribución por frecuencia del recuento de bacterias aerobias mesófilas (BAM) expresado en unidades formadoras de colonia por mililitro de muestra (UFC/mL) obtenido a partir de las 100 muestras de leche pasteurizada evaluadas, encontrándose que 59% presentó un recuento en el orden de 10<sup>1</sup> - 10<sup>2</sup> UFC/mL, 12% de las mismas con un número de microorganismos que osciló entre 10<sup>2</sup> - 10<sup>3</sup> UFC/mL, 21% en el orden 10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup> UFC/mL, 4% con 10<sup>4</sup> - 10<sup>5</sup> UFC/mL y finalmente 4% de las muestras con un recuento en el orden de 10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup> UFC/mL.

**Tabla 2.** Distribución Porcentual del recuento (UFC/mL) de Bacterias Aerobias Mesófilas (según metodología COVENIN 902)

ORDEN (UFC/mL)	FRECUENCIA ABSOLUTA (n)	PORCENTAJE
10 - 10 <sup>2</sup>	59	59
10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>	12	12
10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	21	21
10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	4	4
10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	4	4
<b>TOTAL</b>		100

**UFC/mL** = Unidades formadoras de colonias por mililitro de leche.  
**n** = Numero de muestras

En las figuras 2 y 3 se expresan las distribuciones porcentuales de recuentos de coliformes totales y termotolerantes, obtenidos al evaluar microbiológicamente 100 muestras de leche pasteurizada objeto de este estudio, destacándose que en 55% de las muestras se obtuvo recuentos entre 10 y 100 UFC/mL de coliformes totales y 37% con recuentos entre 8 y 10 UFC/mL de coliformes termotolerantes.

**Figura 2.** Distribución porcentual de recuentos de Coliformes Totales (según metodología APHA)



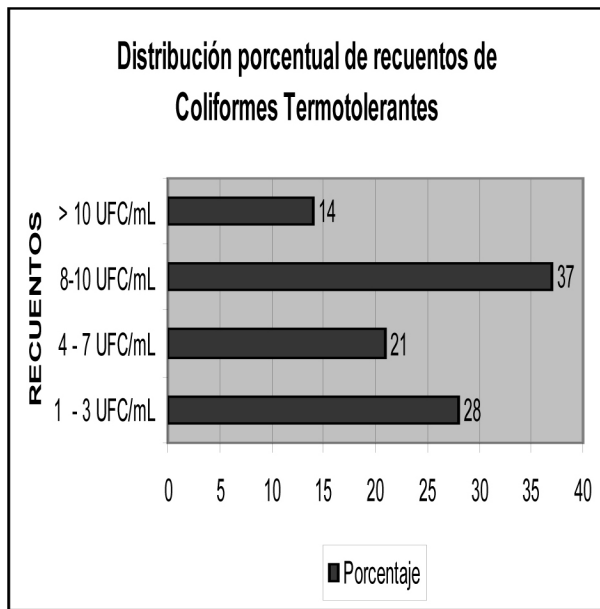


Figura 3. Distribución porcentual de recuentos de Coliformes Termotolerantes (según metodología APHA)

Con relación a la presencia de hongos miceliares en la leche pasteurizada, en la figura 4 se presentan los resultados del porcentaje de unidades formadoras de colonias de mohos por mililitro, aislados a partir de las muestras analizadas, revelando que 100% de las muestras de leche analizadas presentaron un recuento de hongos miceliares dentro de los límites de aceptación, es decir, ninguna muestra excedió el límite recomendado ( $1,0 \times 10^2$  UFC/mL).

Asimismo, en la figura 5 se observa la distribución porcentual del recuento de levaduras en las muestras de leche pasteurizada analizadas; de la misma se desprende que 46% de las muestras se encontraron en el orden de 0 - 10 (UFC/mL), 52% en el orden de 10- 10<sup>2</sup> (UFC/mL) y , resaltando que sólo 2% de las muestras mostraron un recuento superior a 10<sup>2</sup> (UFC/mL) de levaduras, indicando un crecimiento mayor al límite máximo permitido de  $1,0 \times 10^2$  UFC/mL.

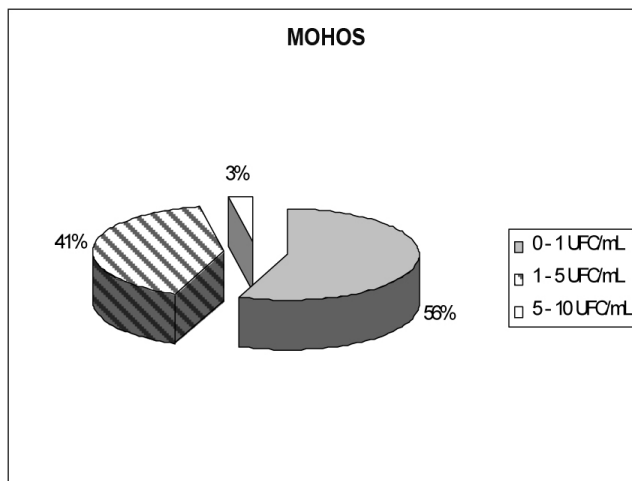


Figura 4. Distribución porcentual de recuento de Mohos (según metodología APHA)

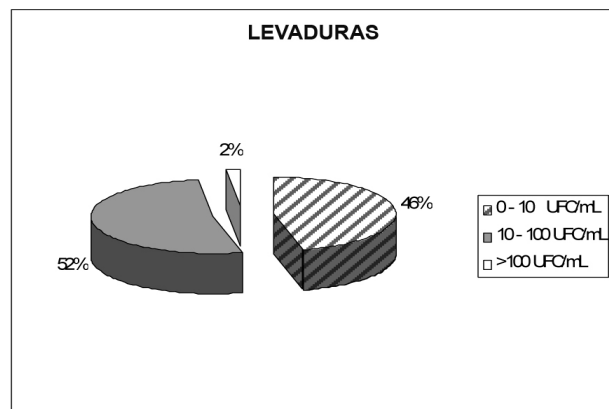
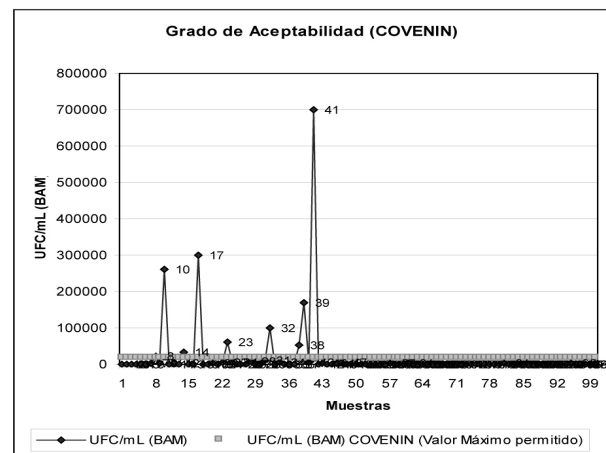


Figura 5. Distribución porcentual de recuento de Levaduras (según metodología de la APHA-1992)

**Grado de aceptabilidad de las muestras de leche pasteurizada según COVENIN.** En la figura 6 se presenta el grado de aceptabilidad de las muestras de leche pasteurizada analizadas, según el recuento de bacterias aerobias mesófilas con relación al valor límite de referencia de  $2.0 \times 10^4$  UFC/mL (ó 20.000 UFC/mL) establecido por la Norma COVENIN 798 (3), apreciándose, según la figura, que la mayoría (92%) de las muestras cumplieron con los límites microbiológicos establecidos en la norma, es decir, presentaban recuentos bacterianos por debajo del valor máximo antes señalado para aerobios mesófilos, según el método de ensayo COVENIN 902 (14), considerándose aceptables o aptas para consumo humano. No obstante, se debe resaltar que de las 100 muestras analizadas, 8% (n=8) correspondiente a las muestras 10, 14, 17, 23, 32, 38, 39 y 41 se encontraron fuera del límite microbiológico para bacterias aerobias mesófilas ( $>2.0 \times 10^4$  UFC/mL), observándose en la figura 6 como puntos por encima de la línea que representa el límite máximo permitido.



UFC/mL = Unidades formadoras de colonias por mililitro de leche pasteurizada.

Valor máximo permitido en COVENIN 798: 1994 =  $2.0 \times 10^4$  o 20.000 UFC/mL

Figura 6. Grado de Aceptabilidad de Muestras de Leche Pasteurizada (n=100) según recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas (COVENIN 798). Valencia, Venezuela.

En la Tabla 3 se presenta el grado de aceptabilidad de las muestras de leche pasteurizada analizadas, según el recuento de Microorganismos Indicadores de Calidad Sanitaria. (Norma COVENIN 798) distinguiéndose, además del 92% de aceptación según BAM, que 55% de las muestras poseían recuentos de coliformes totales dentro de los límites permitidos, y 28% con resultados aceptables según el indicador representado por coliformes termotolerantes; asimismo, 100% y 98% de aceptabilidad según los recuentos de Mohos y Levaduras obtenidos.

**Tabla 3.** Grado de Aceptabilidad de Muestras de Leche Pasteurizada (n=100) según recuento de Microorganismos Indicadores de Calidad Sanitaria. (Norma COVENIN 798).

Parámetro	M (UFC/mL)	% de Aceptabilidad
Aerobios Mesófilos	$2 \times 10^4$	92
Coliformes Totales	$1 \times 10^2$	55
Coliformes termotolerantes	$0,3 \times 10$	28
Mohos	$1 \times 10^2$	100
Levaduras	$1 \times 10^2$	98

UFC/mL = Unidades formadoras de colonias por mililitro de leche.

M = Recuento máximo permitido según Norma COVENIN 798:94

**Tabla 4.** Clasificación de la Leche Cruda según Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas (UFC/mL) (COVENIN 903) y Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) (COVENIN 939) en muestras de Leche Cruda (n=40). Carabobo, Venezuela.

CATEGORÍA	BAM		TRAM			
	n	(%)	CLASE	TIEMPO	N	(%)
A	4	10	I	> 4 horas	12	30
B	4	10	II	4 horas	16	40
C	3	7,5	III	< 4 horas	12	30
SC	29	72,5				

BAM: Bacterias Aerobias Mesófilas. TRAM: Tiempo de Reducción de Azul De Metileno

CLASIFICACION (Norma COVENIN 903-1993) Según Recuento de Aerobios Mesófilos:

A= 500.000 B= 500.001 Hasta 1.500.000 C= 1.500.001 Hasta 5.000.000 SC=  $>5,0 \times 10^6$  UFC/mL

Según TRAM: CLASE I = > 4 horas CLASE II = 4 horas CLASE III = < 4 horas

## DISCUSIÓN

En la presente investigación, al evaluar la calidad sanitaria de muestras de leche pasteurizada en la ciudad de Valencia, según resultados previamente esbozados, se observó una gran variabilidad entre los recuentos de bacterias aerobias mesófilas obtenidos (Tabla 1), reflejado en el amplio intervalo de recuentos de  $1,0 \times 10$  a  $7,0 \times 10^5$  UFC/mL con un valor promedio  $1,8 \times 10^4$ , sin embargo, el grado de aceptabilidad de las muestras de leche pasteurizada, según lo establecido por la normativa venezolana, fue satisfactorio. Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los de otros investigadores, quienes refieren, en leche pasteurizada, recuentos promedios de bacterias aerobias mesófilas alrededor de  $10^4$  UFC/mL. Por ejemplo, Da Silva et al (20) reportaron valores entre  $8 \times 10^4$  y  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL. Así, mismo, Tahiri (21) encontró un recuento de  $3 \times 10^4$  UFC/mL de bacterias aerobias mesófilas en las muestras de leche pasteurizada analizadas. En otros trabajos como el de

**Calidad sanitaria de la leche cruda evaluada.** En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de 40 muestras de leche cruda analizadas mediante la metodología oficial sugerida por las Normas COVENIN para el recuento de bacterias aerobias mesófilas. Del total de muestras analizadas, sólo 20% (n=8) (correspondientes a las categorías A y B) pueden ser utilizadas para la elaboración de leche pasteurizada, mientras que 72,5% (n=29) de las muestras (sin clasificación) no debería utilizarse para consumo humano, según la normativa oficial venezolana (2), indicando la posible contaminación bacteriana durante las operaciones de ordeño, manipulación o almacenamiento antes o durante su traslado a la receptoría (19). Con relación a la prueba del Tiempo de Reducción de Azul de Metileno (TRAM) (COVENIN 939) (16), según la norma COVENIN 903 (2), 30% (n=12) de las muestras analizadas se clasifican como clase I, es decir, presentaron un TRAM mayor de 4 horas, considerándose de buena calidad; en la clase II, con un tiempo de 4 horas, 40,0% de las muestras (n=16) son aceptables; mientras que 30% de las muestras (n=12) se encontró en la clase III, es decir, aquella leche considerada de mala calidad por presentar un TRAM menor a 4 horas (Tabla 4).

Chatterjee et al (22), las muestras de leche pasteurizada no excedieron los límites microbiológicos permitidos. Los resultados aquí plasmados también coinciden con los presentados en otras investigaciones realizadas en Venezuela, entre las cuales destacan Valbuena et al (4), quienes reportaron en un estudio realizado en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, que 85,65% de muestras de leche pasteurizada cumplían con lo normalizado por COVENIN para la carga de bacterias aerobias mesófilas, con una media de  $4,3 \times 10^4$  UFC/mL. También, Díaz y Zambrano (23) muestran en su investigación que al analizar tres diferentes marcas comerciales de leche pasteurizada expendidas en la ciudad de San Cristóbal, Estado Táchira, éstas presentaron recuentos bajos de bacterias aerobias mesófilas, cumpliendo con los límites establecidos en la norma COVENIN 798 (3). Como se señaló en el marco metodológico, otro grupo microbiano determinado, perteneciente a los llamados microorganismos indicadores de calidad sanitaria, fueron

los coliformes totales, los cuales en leche pasteurizada, el número más probable por mililitro de muestra (NMP/mL) no debe sobrepasar de 93, según lo establecido en la norma COVENIN 798 (3); sin embargo, es de hacer mención que en esta investigación en la determinación de coliformes se empleó el método de recuento de coliformes en placas de Petri (14, 24) y no el método del número más probable (NMP), utilizando como valor máximo permitido  $1,0 \times 10^2$  UFC/mL (4). En la Tabla 3 se observó que 55% de las muestras de leche pasteurizada cumplieron con los límites permitidos en cuanto al recuento de coliformes totales. Sin embargo, llama la atención que en 45% de las muestras analizadas la presencia de coliformes totales superó el recuento de  $1 \times 10^2$  UFC/mL. Estos resultados son similares a los obtenidos en Venezuela por Valbuena et al (4), quienes reportaron que 50,93% de muestras de leche pasteurizada superaban el valor exigido por la norma, señalando que esos resultados eran inaceptables ya que representan una contaminación post-proceso, ya que este grupo de microorganismos no soporta el tratamiento térmico de pasteurización. Sin embargo, el índice de coliformes totales en las muestras de leche pasteurizada analizadas, además de representar contaminación de tipo general en el post-proceso, mediante exposición a diversas fuentes de microorganismos ya sean humanas o ambientales, podría ser también el reflejo de condiciones higiénicas inadecuadas en el proceso, como por ejemplo, deficiente desinfección de equipos. Esta carga elevada de microorganismos coliformes puede indicar la posibilidad de presencia y multiplicación de patógenos en los humanos, pues, como se indica en la literatura, algunas bacterias mesófilas normalmente no patógenas entran al cuerpo humano por la vía oral y cuando se encuentran en número muy elevado en los alimentos se reportan como causantes de enfermedades alimentarias en los individuos que los consumen (1). En cuanto a la determinación de coliformes termotolerantes o fecales, tomando en consideración que se ha establecido como recomendación un recuento menor a 3 UFC/mL en leche pasteurizada, se observó que 72% de las muestras analizadas presentaron un índice de contaminación por encima de lo permitido. Se debe mencionar que, de este porcentaje de muestras fuera del límite microbiológico recomendado, 14% exhibió una carga de microorganismos por encima de 10 UFC/mL (figura 3). Los resultados del recuento de coliformes totales y termotolerantes en las muestras de leche pasteurizada analizadas en la presente investigación difieren de los valores conseguidos por Valbuena et al (4), donde se reportan recuentos desde  $4,0 \times 10$  UFC/mL hasta  $1,1 \times 10^3$  UFC/mL; valores tan elevados como los conseguidos por otros investigadores en Venezuela, donde en la ciudad de Maracaibo reportan valores máximos de  $2,0 \times 10^4$  UFC/mL, en la región central del país  $5,8 \times 10^3$  UFC/mL y en el oriente, específicamente en Cumaná, de  $1,3 \times 10^4$  UFC/mL (4). Un factor a considerar con relación al elevado índice de coliformes en general, y que no se evaluó en la presente investigación, es la cadena de frío; condición ésta muy importante al evitar la proliferación de los microorganismos en este tipo de producto y por consiguiente el deterioro del mismo, ya que la temperatura de la leche durante el proceso de pasteurización y almacenamiento es uno de

los factores determinantes en el crecimiento bacteriano. En cuanto a la presencia de hongos miceliarios en la leche pasteurizada, en los resultados expresados en la figura 4 se revela que ninguna muestra excedió el límite recomendado ( $1,0 \times 10^2$  UFC/mL), mientras que según el recuento de levaduras obtenido (figura 4) sólo 2% de las muestras mostraron un crecimiento mayor al límite máximo permitido de  $1,0 \times 10^2$  UFC/mL. Es importante señalar que aun cuando los mohos y levaduras no son señalados en la normativa COVENIN 798 (3) para leche pasteurizada, su detección como indicadores en leche y productos lácteos podría ser de sumo interés para establecer, además de calidad higiénica, la vida útil del producto.

Los efectos que podrían ocasionar en el ser humano van a depender de la cantidad de microorganismos presentes; éstos participan en alteraciones de la leche pasteurizada generalmente cuando la cantidad de colonias se encuentra por encima de  $10^6$  UFC/mL, manifestándose como sabores amargos (por proteólisis), sabores y aromas a frutas, a ácidos, pútridos y otros; pueden originar también viscosidad, además de, como ya se mencionó, disminuir la vida comercial útil de la leche (1).

En otro orden de ideas, se debe destacar que en las muestras de leche pasteurizada evaluadas en esta investigación no se detectó *Salmonella*. Sin embargo, es importante mencionar que en algunas se aislaron enterobacterias como *Enterobacter cloacae* (38%), *Escherichia coli* (45%), *Klebsiella pneumoniae* (27%), *Pseudomonas aeruginosa* (10%), y *Pseudomonas putida* (7%), representando una microbiota de fondo o flora de alteración importante, la cual, aún en bajas concentraciones, podría enmascarar o dificultar el aislamiento de *Salmonella* u otros patógenos, ya que estos microorganismos pueden influir en el crecimiento característico de un patógeno en un alimento, debido principalmente a la producción de metabolitos antimicrobianos por parte de la flora competitiva y por la utilización de los mismos nutrientes (25, 26). Además, las enterobacterias mencionadas pueden sobrevivir a la pasteurización, y aunque su temperatura óptima se ubica en la categoría de mesófilos, en general no se multiplican o lo hacen muy lentamente, a temperaturas inferiores a 7 °C, no causando problemas en la leche pasteurizada durante su vida útil, cuando se refrigera a temperatura apropiada; a diferencia de la presencia de microorganismos psicrotrofos o psicrófilos, como el caso de *Pseudomonas*, que sí podrían causar alteraciones por crecer a temperaturas por debajo de 21 °C, manteniendo activos, bajo tales condiciones, sus sistemas enzimáticos, la permeabilidad celular, la capacidad de degradar sustratos y de sintetizar compuestos (1). En cuanto al contenido microbiano de la leche cruda en Venezuela, Román et al (25), al analizar muestras refrigeradas de leche cruda reportaron un promedio de la carga de bacterias aerobias mesófilas de  $5,2 \times 10^7$  UFC/mL. Otros autores como Román et al (25) y Revelli et al (26), reportaron medias por encima de  $10^7$  UFC/mL y  $10^5$  UFC/mL, respectivamente. Cepero et al (27), en su trabajo encontraron recuentos promedios de 2-3 x  $10^5$  UFC/mL. De manera similar, Dávila et al (28) señalan recuentos de  $1,5 \times 10^6$  y  $3,0 \times 10^6$  UFC/mL. Asimismo, Srairi et al (29) reportaron en su trabajo de investigación,

al analizar muestras de leche cruda, una media de  $4,2 \times 10^8$  UFC/mL. Con relación a este tema, es importante destacar que, entre otros autores, Díaz (1) comenta que cuando la leche cruda es de mala calidad microbiológica, aún cuando se apliquen procesos de higienización, se puede correr el riesgo de accidentes indeseables en la elaboración de productos diversos, con las consiguientes pérdidas económicas, así como la posibilidad de encontrar patógenos en el producto final que implican riesgos a la salud del consumidor. En cuanto a la prueba del Tiempo de Reducción de Azul de Metileno (TRAM) (COVENIN 939) (16), según la norma COVENIN 903 (2) se destaca que 30% de las muestras ( $n=12$ ) resultaron clase III, es decir, leche considerada como de mala calidad por presentar un TRAM menor a 4 horas (tabla 3). Estos resultados coinciden con los valores de TRAM mayor a 8 horas reportados por Chen et al (30); igualmente, Ramírez et al (31) mostraron como resultado de su investigación un alto número de muestras con TRAM mayor a 5 horas, a diferencia de Cepero et al (27), quienes obtuvieron muestras de leche con TRAM de 3,5 horas. Al relacionar el recuento de bacterias aerobias mesófilas (UFC/mL) con los resultados del TRAM, se puede observar que en la mayoría de las muestras de leche cruda no se presentó, como era de esperarse, una relación inversamente proporcional entre ambos parámetros, por lo que estos resultados no reflejaron las condiciones reales de la leche en lo que a carga microbiana se refiere, lo cual pone en duda la confiabilidad del TRAM como prueba de plataforma o método rápido de análisis microbiológico de la leche cruda, utilizada por años en muchas empresas. Autores como Burdová et al (32), Ramírez et al (31) y Fernández y Hernández (33) tampoco encontraron relación inversa entre el recuento bacteriano y el TRAM. La prueba del TRAM consiste en medir el tiempo que tarda una mezcla de leche y azul de metileno en ser decolorada (de azul a blanco o leucobase), y se basa en la capacidad que tienen algunos microorganismos de utilizar el oxígeno disuelto en la mezcla, provocando un descenso del potencial de óxido-reducción y en consecuencia la decoloración del indicador (azul de metileno) (16). Según este fundamento, es de suponer que a medida que aumenta la carga bacteriana en la leche, el indicador de óxido-reducción pasa más rápidamente a su leucobase, representando así un recuento metabólico indirecto; sin embargo, si el número de microorganismos presentes en leche cruda con efecto reductor es bajo, la prueba no concordaría con el recuento bacteriano obtenido en placas, no reflejando, como ya se mencionó, la contaminación microbiana real de la leche, lo cual le hace perder valor como herramienta dentro de las pruebas rápidas.

### CONCLUSIONES

Los resultados de la evaluación de las muestras de leche pasteurizada analizadas, indican que 92% de las muestras cumplieron con los límites para bacterias aerobias mesófilas establecidos en la norma COVENIN. En relación a coliformes totales, 45% de las muestras se encontraron por encima del límite permitido en la Norma y 72% de las mismas excedía el límite de aceptación en cuanto a coliformes termotolerantes. En cuanto a la leche

cruda, de acuerdo con el recuento de bacterias aerobias mesófilas, 72,5% de las muestras presentaron recuentos por encima de los límites establecidos, reflejando condiciones higiénico-sanitarias deficientes al no cumplir con lo establecido en las normas vigentes en Venezuela, contrario a esta afirmación, los resultados del TRAM indican que sólo 30% de las muestras incumplían la norma. Por lo tanto, en este estudio se corroboran los resultados de otros autores en cuanto a la poca confiabilidad del TRAM, la cual ha sido utilizada por años en muchas empresas lácteas venezolanas como prueba de plataforma. Este aspecto debe ser revisado por los entes gubernamentales encargados de establecer las normativas y métodos oficiales en el país. En las muestras de leche pasteurizada evaluadas no se detectó presencia de *Salmonella* spp, sin embargo, los resultados demostraron que es necesario que las autoridades de salud del país implementen medidas más estrictas en el control sanitario de la leche, desde las fincas de ordeño hasta la industria láctea regional, ya que la elevada microbiota en leche cruda y altos recuentos de coliformes totales y termotolerantes en leche pasteurizada, además de disminuir la vida útil de la leche, podrían representar un riesgo potencial a la salud del consumidor.

**Agradecimientos:** Al Departamento de Biología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Carabobo (UC). Al personal del Centro de Investigaciones de Microbiología Ambiental (CIMA- UC), especialmente al Dr. Luis Medina. A la Sra. Glenda Marinelli y la Sra. Yasmaira Montesinos del Laboratorio de Prácticas Profesionales de Bacteriología de la Escuela de Bioanálisis, sede Carabobo (UC).

### REFERENCIAS

1. Díaz C. Microbiología de la leche y de los productos lácteos. Vol. I. Editorial Venezolana C.A. Mérida. Venezuela. 270 pp. 2000.
2. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 903. Leche Cruda. Caracas-Venezuela. Fondonorma. 1993.
3. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 798. Leche Pasteurizada. 2ª revisión general. Caracas, Venezuela. 1994.
4. Valbuena E, Castro G, Lima K, Acosta W, Bríñez W, Tovar A. Calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizada distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Veterinaria. Rev Cient FCV-LUZ 2004; 14: 1-14.
5. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá/ Organización Panamericana de la Salud (INCAP/OPS). Adaptación del Manual 5 Claves de la OMS para la Inocuidad de los Alimentos en Escuelas Primarias de Guatemala. Guatemala.2006. Disponible en: <http://www.who.int/foodsafety/consumer/Guatemala.pdf>
6. Alerte V, Cortés S, Díaz J, Vollaire J, Espinoza M, Solari V, Cerda J, Torres M. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y agua en la Región Metropolitana, Chile (2005-2010). Rev Chil Infect 2012; 29: 26-31.



7. Scallan E, Griffi P, Angulo F, Tauxe R, Hoekstra R. Foodborne Illness Acquired in the United States-Unspecified Agents. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 16-22.
8. Olsen SJ, Ying M, Davis MF, Deasy M, Holland B, Iampietro L et al. Multidrug-resistant *Salmonella Typhimurium* infection from milk contaminated after pasteurization. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 932-935.
9. Araújo V, Pagliares V, Queiroz M, Freitas-Almeida A. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Appl. Microbiol* 2002; 92: 1172-1177.
10. Leedom J. Milk of Nonhuman Origin and Infectious Diseases in Humans. *Clin Infect Dis* 2006; 43:610-615.
11. Castro G, Valbuena E, Bríñez W, Sánchez E, Vera H, y Tovar A. Comparación del empleo de nisina y cultivos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* para la biopreservación de queso blanco. *Rev Cient FCV-LUZ* 2009; 19: 201-209.
12. Prieto M, Mouwen J, López S, Cerdeño A. Concepto de calidad en la industria agroalimentaria. *Interciencia* 2008; 33: 258-264.
13. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 938. Leche y productos lácteos. Métodos para la toma de muestra. Caracas-Venezuela. Fondonorma. 1983.
14. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 902. Método para Recuento de Microorganismos Aerobios en Placa de Petri. Caracas Venezuela. 1987.
15. American Public Health Association (A.P.H.A.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3th. 3<sup>rd</sup> ed. 80 pp. Washington, USA. 1998.
16. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 939. Leche y productos derivados. Método de ensayo, reducción del azul de metileno. Caracas-Venezuela. Fondonorma. 1976.
17. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 1291. Alimentos. Aislamiento e identificación de *Salmonella*. (Ira. rev.). Caracas-Venezuela. Fondonorma. 2004.
18. Milton S. Estadística para Biología y Ciencias de la Salud. 3<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill/ Interamericana de España, S.A.U. 2001.
19. Calderón A, García F, Martínez G. Indicators of raw milk quality in different regions of Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 2006; 11:725-737.
20. Da Silva A, Da Cunha M, Carneiro L, Almeida A, Queiroz M. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. *Rev Saúde Pública* 2001; 35:375-379.
21. Tahiri R. A. comparison on microbial conditions between traditional dairy products sold in Jarak and same products produced by modern dairies. *Pakistan J Nut* 2005; 4: 345-348.
22. Chatterjee N, Bhattacharjee I, Chatterjee S, Chandra G. Microbiological examination of milk in Tarakeswar, India with special reference to coliforms. *Afric J Biotechnol* 2006; 5: 1383-1385.
23. Díaz S y Zambrano M. Calidad microbiológica de tres marcas de leche pasteurizada expendidas en el Sector la Cueva de San Cristóbal. Departamento de Ingeniería de Producción Animal. Universidad Nacional Experimental del Táchira UNET. San Cristóbal, Táchira, Venezuela. 2001.
24. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1086. Alimentos. Método para el recuento de bacterias coliformes en placas de Petri. Caracas-Venezuela. Fondonorma. 1977.
25. Román S, Guerrero L, y Pacheco L. Evaluación de la calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria de la leche cruda almacenada en frío. *Rev Cient FCV-LUZ* 2003; 13: 146-152.
26. Revelli G, Sbodio O, Tercero E. Recuento de bacterias totales en leche cruda de tambos que caracterizan la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero. *Rev Argent Microbiol.* 2004; 36: 145-149.
27. Cepero O, Aguiar J, Pérez I. Efecto de los campos magnéticos en la conservación de la leche cruda sin refrigerar. *REDEVET* 2005; 8: 1-12.
28. Dávila J y Reyes O. Evaluación Microbiológica de las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso tipo Gouda en una Industria Venezolana. *ALAN* 2006; 56:51-59.
29. Srairi M Moudnib J, Rahho L, Hamama A. How do milking conditions affect the hygienic quality of raw milk. Case study from Moroccan dairy farms. *Liv. Res. Rural. Develop.* 2006; 18 (97). Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd18/7/srai18097.htm>
30. Chen P, Chen W, Mao F. Rapid detection of *Salmonella thyphimurium* in chicken carcass wash water using a immunoelectrochemical method. *J Food Prot* 2003; 63: 1043-1048.
31. Ramírez N, Hernández E, González Y. Aplicación del sistema DIRALEC para la evaluación de la calidad microbiológica de la leche en la provincia de Sancti spiritus. VI congreso de la sociedad de cubana de Bioingeniería. Julio 19-22; La Habana. 2005.
32. Burdová O, Baranová M, Lauková A, Rozanska H, Rola J. Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2002; 46: 325-329.
33. Fernández N, y Hernández E. Métodos de ensayos rápidos de detección de microorganismos en la leche. *REDEVET* 2006; 7: 1-18.