

Versión avanzada del sistema Diralec: una tecnología para el análisis de la calidad de la leche

✉ Nardo Ramírez¹, José Álvarez², Pastor Ponce³, Enrique Suárez¹, Juan E Hernández⁴

¹Departamento de Desarrollo, Dirección de Diagnóstico Microbiológico, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, CNIC Ave. 25 esq. 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

²Universidad Agraria de La Habana Fructuoso Rodríguez Pérez

³Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA

⁴Centro Universitario José Martí Pérez, Sancti Spiritus

E-mail: nardo.ramirez@cnic.edu.cu

RESUMEN

El Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) y el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) han venido trabajando conjuntamente por más de una década en el desarrollo del sistema Diralec® para evaluar la calidad bacteriológica de la leche. Diralec-02 es la versión (en fase de desarrollo) más reciente de la familia de equipos Diramic®; es un sistema autónomo y asegurará la comunicación con una computadora a través de un puerto USB. Ello permitirá contar con una base de datos que incluya todos los elementos para el análisis estadístico del comportamiento de la calidad bacteriológica de la leche. El nuevo equipo tendrá como elemento principal un microcontrolador que gobernará todas sus operaciones y permitirá determinar: el nivel de contaminación por *Staphylococcus sp.*, por bacterias coliformes, la presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano, el pH y diagnosticar la mastitis subclínica en la leche, ajustado a las exigencias de la normativa internacional. Además, este sistema deberá clasificar la leche cruda en "excelente", "buena", "regular" y "mala", y la leche pasteurizada, "en norma" y "fuera de norma". Esta clasificación se hará a partir del conteo total de células en la muestra.

Palabras clave: calidad, diagnóstico, Diralec-02, leche, mastitis

Biotecnología Aplicada 2007;24:290-293

ABSTRACT

Advanced version of diralec system: a breakthrough technology for the analysis of the quality of the milk. The National Center for Scientific Research (CNIC) and the National Center for Agricultural Sanitation (CENSA) have been jointly working for over a decade on the development of the Diralec System to evaluate the bacteriological quality of the milk. Diralec-02 is the latest version (now in the development stage) of the family of the Diramic Equipment, which will have autonomous equipment and will ensure communication through USB Port with a personal computer. This will allow having an extensive database which will include all the necessary elements for the statistical analysis of the performance of the bacteriological quality of the milk. As its main element, this new equipment will have a microcontroller governing all its operations. Diralec-02 will be an autonomous system that will allow determining the following in milk: the level of contamination due to *Staphylococcus sp.*, due to coliforms, the presence of inhibitors of bacteria growth, the level of pH of the sample and the diagnosis of mastitis. All this is done in compliance with the demands of international standards. In addition, this system should be able to classify raw milk as "excellent", "good", "fair" or "poor", and the pasteurized milk as "in standard" and "out of standard". These levels of classification will be done as from the total count of cells present in the sample.

Keywords: quality, diagnosis, Diralec-02, milk, mastitis

Introducción

La leche constituye uno de los alimentos fundamentales para el hombre, y su demanda ha aumentado con el paso del tiempo hasta nuestros días. El incremento de los indicadores de su calidad es fundamental, debido a la importancia de suministrar un producto más nutritivo al consumidor y con menos riesgos para su salud. La seguridad de la calidad de la leche empieza en la granja lechera, gracias a las exigencias con la calidad de los productos lácteos. Además de los requerimientos nutritivos, los parámetros de higiene, la presencia de residuos de medicamentos y la afectación por mastitis, son decisivos en la determinación de la calidad de la leche como materia prima [1].

En Cuba existen limitaciones tecnológicas y obsolescencia en los equipos de los laboratorios que se dedican al estudio de la calidad de la leche, lo cual restringe el alcance y las posibilidades analíticas, y no

permite el establecimiento de todos los principios de Buenas Prácticas [2]. Más de 150 de estos laboratorios, no poseen tecnologías analíticas que permitan determinar los indicadores básicos de calidad de la leche, como la detección de la mastitis subclínica, los residuos de antibióticos y la presencia de microorganismos patógenos [3], y por ello no se tiene una valoración real de la situación de estos indicadores en el país. Un problema similar se presenta en países del tercer mundo, que tienen la necesidad de mejorar su capacidad competitiva en el mercado del sector lácteo, tanto en el ámbito nacional como en el mercado internacional [4].

El sistema Diralec®, desarrollado por el Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Cuba (CNIC), se basa en la detección del crecimiento bacteriano, que ocurre en un medio de cultivo inoculado

1. Cullor JS. Bioseguridad en la granja lechera. III Congreso nacional de control de mastitis y calidad de la leche; León, Guanajuato, México. 21 al 23 de junio del 2001.

2. Ponce P. Producción y calidad de la leche. Aspectos técnicos y prácticos para técnicos de producción del trópico americano. Monografía CENLAC/CENSA La Habana, Septiembre; 1998.

3. Ponce P, Hernández JE, Álvarez J, Contreras R, Armenteros M, Dávila N, Ramírez N, González IH, Fuentes H, Labrada J. Diralec®: aplicaciones prácticas de una tecnología cubana para el análisis integral de la calidad de la leche. 14 Congreso Internacional; CNIC, La Habana, Cuba. 27 al 30 de junio del 2005.

con la muestra que se desea estudiar. La detección del crecimiento bacteriano se realiza a partir de la medición de los cambios de turbidez que tienen lugar en un medio de cultivo inoculado con la muestra bajo análisis en un período de 8 horas. La magnitud del crecimiento se mide en UFC/mL, mediante la aplicación de métodos fotométricos, desarrollados específicamente para este fin [5].

Con la utilización del sistema Diralec® se estima la calidad de la leche a partir de:

- a) El grado de contaminación de la leche cruda a las 8 horas a partir de los cambios de turbidez.
- b) En función de la sensibilidad buscada, se precuba la leche pasteurizada 6 o 15 horas y se clasifican las muestras en dos categorías, “en norma” o “fuera de norma” [6]. En ninguno de los dos casos las lecturas son destructivas y permite darle continuidad a las muestras para una mejor interpretación.

Antecedentes y estado actual del tema

El CNIC ha desarrollado el sistema Diralec® para evaluar la calidad bacteriológica de la leche a partir de muestras de leche cruda o pasteurizada. La primera versión de este sistema se instaló en el equipo Diramic 03c a principios de la década de los años 90 (Figura 1). El Diramic 03c está basado en el microprocesador Z80. A fines de esta misma década, surgió una nueva versión del sistema Diralec®, y se utilizó como soporte una computadora personal.

El sistema Diralec®, instalado en el equipo Diramic 03c, tenía marcadas limitaciones de procesamiento y de almacenamiento de los datos, propias de la tecnología de los microprocesadores, por lo que una vez agotada la producción inicial, no se continuó produciendo este modelo.

El sistema Diralec® computarizado utiliza una tarjeta de adquisición de datos como interfaz de comunicación con una computadora personal (Figura 2). Esta tarjeta de adquisición va colocada en un bus ISA, presente en los ordenadores antiguos. Debido al rápido desarrollo tecnológico, este tipo de bus se ha ido eliminando de los ordenadores actuales. Además, las características constructivas de los nuevos modelos han variado notablemente, por lo que se dificulta el



Figura 1. Sistema Diralec® acoplado al equipo Diramic 03c.



Figura 2. Sistema Diralec® computarizado.

ensamblaje y la manipulación del sistema en el interior de la computadora.

En Cuba existe una red de equipos, integrada por diez complejos lácteos, que emplean el sistema Diralec® instalado en el equipo Diramic 03c. Además, el Ministerio de Educación Superior (MES) cuenta con una red del sistema Diralec® computarizado, integrada por ocho universidades.

Sistemas para determinar la calidad de la leche

Medidor de grasa MK 2.5

El medidor de grasa MK 2.5 permite determinar con rapidez y precisión el porcentaje de grasa de la leche y sus derivados.

Crioscopio electrónico digital MK 540 y crioscopio electrónico MC 5400

Los crioscopios electrónicos MK 540 y MC 5400 se emplean para la determinación del punto de congelación de la leche. El punto de congelación normal de la leche es constante, aunque existen diferencias en dependencia del hábitat de la vaca, de la raza y de su alimentación, entre otras razones. Al determinar este parámetro se puede precisar, incluso cuantitativamente, si la leche fue adulterada por la adición de agua, ya que, de ser así, el punto de congelación se acerca a 0 °C [7].

Bax System

Bax System analiza la presencia de bacterias patógenas en los alimentos, por medio de la detección del ADN [8].

Bentley 150 Combi, Bentley 2300 Combi, Bentley 2500

Bentley 150 Combi, Bentley 2300 Combi y Bentley 2500 es una familia de analizadores infrarrojos de precisión para determinar grasa, proteína, lactosa, conteo de células somáticas y sólidos totales en muestras de leche y otros productos lácteos [9].

La familia de equipos LactoScope Filter-Model C3, LactoScope Filter-Model C4+ y LactoScope FTIR Auto 400, basados en la tecnología de absorción infrarroja, permite determinar el contenido de grasa, proteína y sólidos totales grasos y no grasos en mues-

4. Castañeda R. “El pago de la leche por calidad como herramienta para la mejora de la competitividad de la cadena agroalimentaria de la leche”. I Simposio Internacional de Producción Animal sustentable; Acapulco, México. 21 al 23 de febrero del 2002.

5. Sistema de programas en Windows para la evaluación de la calidad bacteriológica de la leche (Diralec®). Tillán G, Álvarez E, Hernández JE. Revista CENIC Ciencias Biológicas (2006); Vol. 36, No. especial.

6. Norma Cubana NC- 78-05. Industria láctea. Leche pasteurizada. Especificaciones de calidad; 1988.

7. <http://www.splabor.com.br/orcamento-add.asp?produto=251&codigo=4&modelo=4305>. Consultado 29 de marzo del 2007.

8. <http://www.foodqualitynews.com/news/ng.asp?id=13242-bax-system-adopted>. Consultado 29 de marzo del 2007.

9. <http://www.bentleyinstruments.com/combi.html>. Consultado 29 de marzo del 2007.

tras de leche fluida, helados, leche concentrada, leche evaporada y suero concentrado [10].

SomaScope-Model MKII Auto 200 y SomaScope-Model MKII Auto 400 son contadores de células somáticas, y se basan en la tecnología de citometría de flujo de fluorescencia. La citometría de flujo es una técnica analítica reconocida por la Federación Internacional de productos lácteos (IDF). La precisión de este sistema le permite determinar entre 10^5 y 10^6 células/mL en muestras de leche cruda. CombiScope-Model FTIR 400 es un sistema integrado de análisis de leche cruda, que consiste en un espectrómetro LactoScope FTIR y un citómetro de flujo SomaScope, y permite determinar la composición de la leche, realizar el conteo de células somáticas y precisar su punto de congelación [10].

La compañía FOSS provee una gama versátil de soluciones, desde la línea del laboratorio hasta soluciones en línea de producción para analizar leche cruda y productos lácteos acabados. Las soluciones incluyen análisis de la composición, recuento de células somáticas y calidad higiénica de la leche cruda, así como análisis de composición y microbiológico de productos acabados como el queso y el yogur. Algunos de los sistemas producidos por FOSS son: BactoScan™ FC, Fossomatic™ 5000, MicroFoss™, MilkoScan Minor, MilkoScan™ FT2 y CombiFoss™ 5000 [11].

Debido a la tecnología que emplean, la velocidad de procesamiento y los elevados volúmenes de muestras que permiten analizar estos sistemas, son muy costosos, su precio oscila entre 50 000 y 150 000 dólares. Generalmente son soluciones dirigidas a la línea de producción de grandes plantas o complejos lácteos, así como para laboratorios concentradores de grandes cantidades de muestras, lo cual no se corresponde con la infraestructura ganadera de los países del tercer mundo o de limitado desarrollo en el sector lechero.

Sistema Diralec-02: nuevas aplicaciones

Diralec-02 es un equipo autónomo y asegurará una comunicación, a través de un puerto USB, con una computadora personal, lo cual permitirá contar con una extensa base de datos que incluya todos los elementos para el análisis estadístico del comportamiento de la calidad bacteriológica de la leche. Entre sus nuevas aplicaciones, este sistema permite determinar la presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano, así como el pH de la muestra y el diagnóstico de la mastitis subclínica, ajustado a las exigencias de la normativa internacional: variables de gran importancia para evaluar la calidad de la leche. Además, al igual que las versiones anteriores, permitirá determinar el nivel de contaminación por bacterias coliformes y el conteo total de bacterias en la leche.

La conductividad eléctrica y la mastitis

La mastitis bovina es la enfermedad más común de la vaca lechera. Su daño implica mucho gasto económico, no solo por las pérdidas que ocasiona a los productores primarios, sino también a la industria lechera; entre otras razones, por la disminución en el rendimiento y la calidad de la leche, asociados con el aumento del número de células somáticas [12].

La leche tiene propiedades conductoras debido a sus componentes, especialmente las sales minerales. La conductividad eléctrica se debe al contenido total iónico de la leche, mayormente, de cloro, sodio y potasio, y en menor medida, de calcio, magnesio y fósforo. Esta se determina, en lo fundamental, por los iones de sodio y cloruro [13-15].

El incremento de la permeabilidad celular asociado a las infecciones bacterianas y a otros cambios fisiológicos o traumáticos, son la causa de una disminución de la lactosa y del incremento de sodio y cloruros [16].

El uso de la conductividad eléctrica como indicador del estado de salud de la ubre se ha ido perfeccionando en los últimos 30 años, y a partir de la década de los 90 del siglo XX, se han establecido nuevos criterios [17]. El diseño de sistemas computarizados de medición, acoplados a los equipos de ordeño, permiten obtener la información de la conductividad eléctrica, la temperatura y el volumen de leche de cada cuarto, y detectar posibles cambios, antes de que aparezcan los síntomas clínicos de la mastitis. La rapidez y posibilidad de integración de varios indicadores, hacen que este método tenga un valor práctico superior a otros procedimientos de diagnóstico conocidos [18].

Inhibidores del crecimiento bacteriano en la leche

Por su amplio uso en la medicina veterinaria, los antibióticos son los principales residuos en la leche. Estos se emplean en la ganadería como medicamentos terapéuticos y profilácticos. Junto con los detergentes y desinfectantes, los antibióticos se incluyen en el grupo de sustancias que inhiben el crecimiento bacteriano, conocidas comúnmente como "inhibidores". En este contexto, ocupan un papel fundamental. La mayor fuente de contaminación de la leche son los tratamientos intramamarios [19].

La presencia de agentes antimicrobianos en la leche crea numerosos inconvenientes a la industria láctea, ya que la mayoría de ellos ejercen su acción contra las bacterias lácticas. Los inhibidores entonces, impiden o retardan el desarrollo de estas bacterias, o modifican la relación entre los microorganismos presentes en el fermento, con las respectivas consecuencias tecnológicas adversas.

Ello induce productos con graves defectos, que deben ser descartados, y requiere mayores costos de elaboración, gastos de materia prima y alteración del programa de producción, lo cual implica una pérdida con irremediabilidad para la empresa [20].

Características del sistema Diralec-02

Diseño eléctrico

En el diseño eléctrico del sistema Diralec-02 se emplea el microcontrolador MSP430FG438 de la Texas Instruments; uno de los más recientes microcontroladores de la familia MSP430. Junto con un software asociado, este microcontrolador garantiza el control de los módulos del sistema: pH, conductividad eléctrica, temperatura y óptico, impresora térmica, pantalla gráfica, así como la atención al teclado, la comunicación USB y el almacenamiento de los datos. La tarjeta electróni-

10. <http://www.deltainstruments.com/>. Consultado 29 de marzo del 2007.

11. <http://www.foss.dk/SolutionsProductsDirect.aspx>. Consultado 29 de marzo del 2007.

12. Philpot W. Importancia de la cuenta de células somáticas y los factores que la afectan. III Congreso nacional de control de mastitis y calidad de la leche; León, Guanajuato, México. 21 al 23 del junio del 2001.

13. Lensbergen L, Nielen M, Pengov A, Schukken H. Evaluation of prototype On-Line Electrical conductivity system for detection of subclinical mastitis. *J Dairy Sci* (1994); 77(4):1132-40.

14. Nielen M, Schukken H, Brand A. Detection of subclinical mastitis from on-line milking parlor data. *J Dairy Sci* (1995); 78(5):1039-49.

15. Biggadike H, Ohnstand I, Hillerton E, Bridgents A. A practical evaluation of milk conductivity measurements. *Proc. British Conf. Skeplot Mallet. Institute for animal Health: Milk Development council*; 2000. p. 56-61.

16. Shoshani E, Berman A. Subclinical mastitis assessed by deviation in milk yield and for detection of subclinical mastitis. *J Dairy Sci* (1998); 75(2):606-14.

17. Norberg E, Rogers GW, Goodling RC, Cooper JB, Madsen P. Genetic Parameters for Test-Day Electrical Conductivity of Milk for First-Lactation Cows from Random Regression Models. *J. Dairy Sci* (2004); 87:1917-24.

18. Moallen U, Gur P, Shpigel N Maltz. E graphic monitoring of the course of some Clinical conditions in Dairy cows using a computerized Dairy management system. *Israel Vet Medical Ass* (2002); 57(2):1-6.

19. Noa M. Gestión de calidad higiénica y nutricional de la leche residuos y contaminantes químicos en la leche III Congreso nacional de control de mastitis y calidad de la leche; León, Guanajuato, México. 21 al 23 de junio del 2001.

20. Álvarez LJ. Nuevos usos del sistema Diramic en la evaluación de la calidad de la leche. Tesis en opción del título de Doctor en Ciencias Veterinarias, Universidad Agraria de La Habana Fructuoso Rodríguez Pérez, diciembre 2006.

ca se fabrica a partir de la tecnología de montaje superficial, lo que garantiza un diseño mucho más compacto y fiable, que incluye las técnicas de apantallamiento y guarda, requeridas para lograr una exactitud de ± 0.01 unidades de pH y conductividad eléctrica.

Calibrador de inóculo

Empleando un calibrador de inóculo basado en el principio óptico de medición, es posible determinar el nivel de contaminación por *Staphylococcus sp.*, por bacterias coliformes, la presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano, y se podrá realizar el conteo total de células presentes en la muestra.

Medición de pH

Los usuarios del sistema tendrán la posibilidad de realizar mediciones de pH a muestras de leche y derivados lácteos. El electrodo de pH incluye un sensor de la temperatura de la muestra de leche y que a su vez permite compensar esta medición de forma automática. Ello garantiza que los valores tengan una exactitud de ± 0.01 unidades de pH.

Medición de conductividad eléctrica

Los usuarios podrán realizar mediciones de conductividad eléctrica a muestras de leche y derivados lácteos para la cual tendrá en cuenta la compensación automática de la temperatura y será un indicador de la contaminación por mastitis subclínica. Según reportes, el 70% de las vacas lecheras en nuestro país padecen esta enfermedad, de ahí la importancia de su diagnóstico. La mastitis constituye la enfermedad de mayor prevalencia en el ámbito internacional [21]. Las mediciones de conductividad eléctrica tendrán una exactitud de ± 0.01 unidades.

Teclado de membrana y pantalla gráfica

El usuario podrá interactuar con el equipo a través de un teclado de membrana con efecto táctil que le ayudará a acceder a las distintas prestaciones. En una pantalla gráfica (10 cm x 8 cm) de cristal líquido (LCD) se mostrarán diferentes rutinas, así como el resultado de las mediciones.

Capacidad de comunicación con una computadora

La comunicación con una computadora se establece mediante un puerto USB 2.0, se ejecuta una aplicación de Windows que posibilitará descargar la tabla completa del estado de las muestras desde el equipo. Esta aplicación en Windows permitirá localizar los datos originales de las muestras: su origen, vaquería, ruta, si es leche de andén o de tanque, el tipo de leche (cruda, pasteurizada, etc.), el especialista que realizó el análisis, en qué fecha y a qué hora.

Capacidad de impresión térmica

El sistema lleva acoplado un módulo de impresión al cual se le incorpora un rollo de papel de 2 pulgadas de

ancho. El fabricante garantiza su buen funcionamiento hasta los 50 km de papel impreso. En un laboratorio, donde se imprima el resultado de 200 muestras diarias como promedio, la vida útil de la impresora superará los 8 años.

Calendario

El calendario permitirá mostrar la fecha y la hora en que se realizan las mediciones, requisito indispensable en el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio.

Capacidad total de muestras

El equipo tendrá una capacidad de almacenamiento suficiente para guardar el resultado del análisis de más de 10 000 muestras.

Ventajas y desventajas de Diralec-02 en comparación con equipos homólogos en el mercado

Ventajas

1. Es un equipo más barato: al menos cinco veces menos que el equipo homólogo menos costoso.
2. Tiene buen nivel de integración: permite realizar varios análisis.
3. Reduce el consumo de medios de cultivo entre un 85 y un 90%.
4. Se fabrica en Cuba.
5. Es de fácil manipulación.
6. Se ajusta a la situación actual de la lechería. Un equipo muy moderno y sensible suele ser un problema.

Desventajas

1. Diralec-02 es un equipo menos sensible, es decir, no distingue niveles por debajo de 100 000 UFC/mL.
2. Tiempo de detección entre 2 y 8 horas.
3. Menos automatizado. Necesita realizar dos lecturas para dar el resultado.

Conclusiones

Las nuevas posibilidades de análisis incorporadas al sistema Diralec-02 permitirán a la Industria Láctea cubana equipar sus laboratorios, complejos y vaquerías con un sistema moderno, acorde con las exigencias y necesidades de la industria nacional, así como aumentar el rango de sus técnicas de análisis y mejorar sus principios de buenas prácticas.

La determinación de indicadores básicos de calidad de la leche, así como la detección de la mastitis subclínica, inhibidores del crecimiento bacteriano y presencia de microorganismos patógenos, permitirá tener una valoración real de su situación en Cuba, además de la obtención de una materia prima de mayor calidad.

El sistema Diralec-02 también representará para nuestra empresa la posibilidad de insertarse en el mercado de los sistemas dedicados a determinar la calidad de leche, principalmente en el latinoamericano.

21. http://www.elhabanero.cubaweb.cu/2007/marzo/nro1861_mar07/cienc_07mar498.html. Consultado 5 de abril del 2007.