

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE AGRONOMIA



" ANALISIS MICROBIOLOGICO DE PRODUCTOS LACTEOS "

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

P R E S E N T A :

MA. GUADALUPE TOSCANO LOPEZ

Las Agujas Mpio. de Zapopan Jal. Nov. 1992



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE AGRONOMIA

SECCION ESCOLARIDAD

EXPEDIENTE _____

NUMERO 0639/92

07 de Septiembre de 1992.

C. PROFESORES:

QFB. THELMA GPE. CARRILLO RODRIGUEZ, DIRECTOR
M.C. SALVADOR MENA MUNGUITA, ASESOR
MVZ. ADRIANA NATHAL VERA, ASESOR

Con toda atención me permito hacer de su conocimiento, que habiendo sido aprobado el Tema de Tesis:

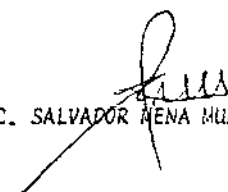
" ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS LÁCTEOS."

presentado por el (los) PASANTE (ES) MA. GUADALUPE TOSCANO LOPEZ

han sido ustedes designados Director y Asesores, respectivamente, para el desarrollo de la misma.

Ruego a ustedes se sirvan hacer del conocimiento de esta Dirección su Dictamen en la revisión de la mencionada Tesis. Entre tanto, me es grato reiterarles las seguridades de mi atenta y distinguida consideración.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
"AÑO DEL BICENTENARIO"
EL SECRETARIO


M.C. SALVADOR MENA MUNGUITA

mam

nyr



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE AGRONOMIA

Sección ESCOLARIDAD....

Expediente

0699/92

Número

07 de Septiembre de 1992.

ING. JOSE ANTONIO SANDOVAL MADRIGAL
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE

Habiendo sido revisada la Tesis del (los) Pasante (es)

MA. GUADALUPE TOSCANO LOPEZ

titulada:

" ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS LÁCTEOS."

Damos nuestra Aprobación para la Impresión de la misma.

DIRECTOR

QFB. THELMA GPE. CARRILLO RODRIGUEZ

ASESOR

ASESOR

M.C. SALVADOR MENA MUNGUÍA
MVZ. ADRIANA NATHAL VERA

SPC

lyr

Al contrastar este afiche cifrese fecha y número

A TI DIOS:

Por darme la oportunidad
de ser lo que soy.

GRACIAS.

Sr. Ing. Ignacio Mosara Luna,
a quien tanto admiro y agradezco
profundamente, el apoyo que me dió
para lograr uno de mis mas grandes
anhelos.

A mi querida Universidad
de Guadalajara y Facultad
de Agronomía.

A mis asesores:
M.V.Z. Adriana Nathal Vera.
M.C. Salvador Mena Munguía.

A usted maestra Thelma Gpe.
Carrillo de Camacho, quien
compartió conmigo sus cono-
cimientos y me motivó para
superarme cada día más.

A ustedes Q.F.B.
Cristina Torres de Zatarain
y T.Q.F. Esther Michel de Mora,
con mucho cariño y agradecimiento
por darme parte de su valioso
tiempo por mis ideales.

A la Lic. T.S. Martha Toscano de
Ramírez, con grán cariño y agra-
decimiento por sus conocimientos
que tan desinteresadamente me -
trasmitió para la realización de
la presente tesis.

GRACIAS: Dr. Ramón Cervantes Munguía.
Lic. Carlos Ríos Camarena.
Lic. Rodolfo Antón Valencia.
Por su ayuda para lograr la culminación
de mis estudios.

A. Ma. del Rosario Toscano L.
Por su valiosa ayuda.

A mi MADRE:

A quien tanto quiero y admiro
por enseñarnos con su ejemplo
a enfrentar la vida con decisión
y fortaleza.

Con mucho cariño a mis hermanas.

A los Ings. Quims.

Blanca y Pepe Moreno y Sahagun.

INDICE

	PAGINAS.
CAPITULO I.	
INTRODUCCION.	9
JUSTIFICACION.	11
OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES.	12
HIPOTESIS.	13
 CAPITULO II.	
MARCO TEORICO Y REFERENCIAL.	
Antecedentes históricos.	15
Fundamentación Jurídica.	17
Técnicas y Procedimientos de análisis.	26
Toma de Muestra.	27
Preparación de la Muestra.	30
Preparación de las diluciones decimales.	32
Cuenta de bacterias mesofílicas aerobias.	36
Cuenta de organismos coliformes.	42
Número mas probable de coliformes fecales (NMP)	46
Cuenta de hongos y levaduras.	53
Cuenta de Staphylococcus aureus.	56
Investigación de Salmonella.	64
 CAPITULO III.	
DISEÑO DE LA INVESTIGACION.	77
 CAPITULO IV.	
INTERPRETACION DE RESULTADOS.	82
 CAPITULO V.	
CONCLUSIONES.	85
 BIBLIOGRAFIA.	 87
 ANEXOS.	
Preparación de reactivos y colorantes.	90

INTRODUCCION.

Los productos lácteos comprenden varios alimentos - perecederos elaborados a partir de la leche, siendo los principales: quesos, crema, mantequillas, helados y leches acidificadas. Dado que estos alimentos poseen las características y elementos necesarios para el desarrollo bacteriano, el control microbiológico de estos es indispensable para evaluar -- las condiciones higiénicas en que fueron elaborados, la eficiencia de los procesos a que fueron sometidos y para determinar la vida útil del producto y los posibles riesgos al consumidor, para su amplia distribución y consumo. Ya que son ingeridos en forma directa sin tratamiento previo.

Debido a que cada uno de estos productos presentan diferentes características, los riesgos a la salud también -- son diversos.

Los quesos pueden ser frescos o maduros, en forma - natural o por adición de cultivos bacterianos o de hongos, -- son producidos a partir de leche, por la acción de cuajo enzimático por ello además de reunir todos los elementos nutritivos también contienen las condiciones de humedad para el desarrollo de muchos microorganismos.

La crema aunque en menor proporción contiene todos los elementos de la leche, conteniendo de un 30 a 37% de grasa; por lo que es un alimento muy susceptible de contaminación.

La mantequilla debido a que es preparada a partir de la crema de leche su contenido graso no es propicio para el desarrollo de microorganismos. Sin embargo puede contaminarse por la mala calidad de la materia prima, y el agua utilizada en su fabricación.

Desarrollándose generalmente los microorganismos en las gotas de agua que se encuentran entre los glóbulos de grasa. Las principales alteraciones de este alimento los producen los hongos.

Los helados son alimentos congelados obtenidos por la mezcla de diversos ingredientes tales como: suero de leche, leche en polvo, leche, estabilizantes, edulcorantes y emulsificantes. Pueden estar adicionados de frutas congeladas, frescas concentradas, desecadas, nueces, con saborizantes naturales o artificiales.

Por ellos cualquiera de estos productos pueden contribuir con su carga microbiana a la contaminación del producto final.

Las leches acidificadas se elaboran a partir de leche pasteurizada acidificada por cultivos lácteos. Por ello su calidad sanitaria está relacionada con la materia prima utilizada, y su contaminación puede deberse a malas prácticas higiénicas en su preparación, conservación y manejo.

JUSTIFICACION.

El presente trabajo es un estudio basado en mi experiencia profesional, sobre los riesgos potenciales a la salud, originados por el consumo de productos lácteos que se expenden ignorando la flora microbiana que se desarrolla en este tipo de sustratos, por no llevar a cabo los análisis microbiológicos para detectar la calidad sanitaria desde la materia prima, producto terminado, almacenamiento y distribución, mismo que pone en peligro la salud de el consumidor, ya que esto conlleva a un deficiente control de calidad, disminuyendo así competitividad en el mercado.

Por lo anterior es que ha surgido la inquietud de investigar y dar a conocer a todas aquellas personas interesadas en aplicar las técnicas de análisis microbiológicos, para elevar la calidad de dichos productos lácteos en beneficio de su propia industria. Así como de la población consumidora. Por ello es que se ha investigado en la Secretaria de Salud, las técnicas establecidas por esta destinadas a garantizar la inocuidad de estos productos. A fin de proteger la salud y bienestar de la sociedad consumidora.

O B J E T I V O S .

OBJETIVO GENERAL

Describir las diferentes técnicas y procedimientos en el análisis de productos lácteos establecidos por la Secretaría de Salud.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1.1 Elevar el nivel de salud en la población consumidora de productos lácteos.

1.2 Promover la calidad sanitaria en el manejo y elaboración, tanto en la materia prima como de producto terminado en lo referente a lácteos.

1.3 Describir las técnicas y procedimientos del análisis microbiológico en la elaboración y manejo de productos lácteos.

H I P O T E S I S .

1.- El consumir productos lácteos sometidos a control de calidad microbiológica, disminuye el índice de enfermedades en la población consumidora, y por ende eleva el nivel de salud.

2.- Al utilizar adecuadamente las técnicas y procedimientos se elevará la calidad sanitaria en el manejo y elaboración, tanto de la materia prima como en el producto terminado en lo que se refiere a lácteos.

3.- Las técnicas y procedimientos a los que se sujeta la elaboración de productos lácteos, consiste en el análisis del producto terminado y la normatividad establecida por la -- Secretaría de la Salud.

A N T E C E D E N T E S H I S T O R I C O S .

A través del tiempo tanto los industriales como los organismos e instituciones oficiales, encargados del control microbiológico de los alimentos, llegaron a la conclusión que no basta encontrar el significado de los grupos y especies de los microorganismos, así como contar con normas standards o especificaciones microbiológicas que deben cumplir los alimentos, si no está basada en el empleo de métodos efectivos para la detección y el recuento de los microorganismos correspondientes; si no se cuenta con técnicas y métodos que sirvan de fundamento.

Con este fin, en 1962 se constituyó el Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos. (ICMSF), - dependiente de la Asociación Internacional de Sociedades de - Microbiología (IAMS). Este comité intenta contribuir a la tarea de promocionar normas de calificación comparables a los - países que tienen montado un servicio con medios abundantes - para el control de los alimentos, y procedimientos útiles a - los países en desarrollo, intenta también estimular las garantías sanitarias en el comercio internacional de alimentos y - obviar las dificultades producidas por opiniones y normas no correctas acerca del significado del contenido microbiano de los alimentos.

Los miembros de este Comité pertenecen a organismos oficiales relacionados con la sanidad o la agricultura, o trabajan en la industria o en las universidades, y por ello, - - aportan y representan intereses variados. En el Comité están representados 19 laboratorios de 11 países.

Las reuniones realizadas en Cambridge, Inglaterra - y Viena, Austria (1965), Moscú, Rusia (1966) y Londres Ingla-

-terra, 1967 del ICMSF. Dá a conocer los acuerdos y conclusiones de dichas reuniones cuyo fin es triple.

1.- Señala la presencia y el significado de determinados microorganismos en los alimentos.

2.- Aconseja los métodos más adecuados para la detección y el recuento de los grupos específicos de microorganismos transmitidos por los alimentos, y para la puesta en evidencia de las toxinas, causantes de intoxicaciones alimenticias cuando ello es realizable.

3.- Dar la composición de los medios de cultivo recomendados y el modo de su preparación, así como señalar los reactivos y las pruebas diagnósticas.

En México las técnicas utilizadas en el Laboratorio Nacional de Salud Pública, desde 1975 provienen en la mayoría de los casos, de las recomendaciones hechas por el Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos (ICMS), concientes de la importancia de lograr la máxima uniformidad en la metodología utilizada entre todos los países.

No obstante, tomando en cuenta el nivel del desarrollo técnico de nuestro país en esta especialidad y por razones de carácter económico, se han introducido modificaciones a fin de hacerlas mas accesibles y prácticas. De cualquier forma se insiste en la necesidad de seguir cada técnica, precisamente en los términos que en cada caso se señalan.

FUNDAMENTACION JURIDICA (1)

Siendo presidente Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos Miguel de la Madrid Hurtado. El Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, decretó la Ley General de Salud, -- siendo publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 7 de febrero de 1984. El Capítulo Único del Título Primero, -- referente a las disposiciones generales, a la letra dice:

"Art. 1º.- La presente ley reglamenta el derecho a la protección de la salud, que tiene toda persona en los términos del artículo 4º de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, establece las bases y modalidades para el acceso a los servicios de salud, y la concurrencia de la Federa- -- ción y las entidades federativas en materia de salubridad general. Es de aplicación en toda la República y sus disposiciones son de orden público en interés social.

Art. 2º.- El derecho a la protección de la salud, tiene las siguientes finalidades:

I.- El bienestar físico y mental del hombre para contribuir al ejercicio pleno de sus capacidades;

II.- La prolongación y el mejoramiento de la calidad de la vida humana.

III.- La protección y el acrecentamiento de los valores que coadyuvan a la creación, conservación y disfrute de -- condiciones de salud que contribuyan al desarrollo social;

(I) Para efectos de este trabajo se tomó en cuenta solamente el articulado relativo a la Reglamentación Jurídica en Materia de Alimentos.

IV.- La extensión de actividades solidarias y responsables de la población en la preservación, conservación, mejoramiento y restauración de la salud;

VII.- El desarrollo de la enseñanza y la investigación científica y tecnológica para la salud.

Art. 39.- En los términos de esta ley, es materia de salubridad general:

VII.- La organización, coordinación y vigilancia del ejercicio de las actividades profesionales, técnicos y auxiliares para la salud;

VIII.- La promoción de la formación de recursos humanos para la salud.

IX.- La coordinación de la investigación para la salud y el control de ésta en los seres humanos;

X.- La información relativa a las condiciones, recursos y servicios de salud en el país.

XV.- La prevención y el control de las enfermedades transmisibles;

XXII.- El control sanitario de productos y servicios y de su importación y exportación;

XXIV.- El control sanitario de los establecimientos dedicados al proceso de los productos incluido en la fracción XXII.

XXV.- El control sanitario de la publicidad, de las actividades, productos y servicios a que se refiere esta ley;

Artículo 4º Son autoridades sanitarias:

- I.- El Presidente de la República;
- II.- El Consejo de Salud General;
- III.- La Secretaría de Salud, y
- IV.- Los gobiernos de las entidades federativas, incluyendo el del Departamento del Distrito Federal."

Con respecto a las enfermedades transmisibles se contempla en el Capítulo II.

"Art. 134.- La Secretaría de Salud y los gobiernos de las entidades federativas, en sus respectivos ámbitos de competencia, realizarán actividades de vigilancia epidemiológica, de prevención y control de las siguientes enfermedades transmisibles:

- I.- Cólera, fiebre tifoidea, paratifoidea, shigelosis amebiasis, hepatitis virales, y otras enfermedades infecciosas del aparato digestivo."

El control sanitario de productos y servicios y de su importación y exportación, se reglamenta en el Título Decimosegundo, Capítulo I. Que corresponde a las Disposiciones comunes.

"Art. 194.- Para efectos de este título, se entiende por control sanitario, el conjunto de acciones de orientación, educación, muestreo, verificación y en su caso, aplicación de medidas de seguridad y sanciones, que ejerce la Secretaría de Salud. Con la participación de los productores, comercializadores y consumidores, en base a lo que establecen las normas técnicas y otras disposiciones aplicables.

El ejercicio del control sanitario será aplicable al:

1.- Proceso, importación y exportación de alimentos, bebidas no alcohólicas, bebidas alcohólicas, productos de perfumería, belleza y aseo, tabaco, así como de las materias primas y, en su caso, aditivos que intervengan en su elaboración.

Art. 196.- La Secretaría de Salud emitirá las normas técnicas a que deberá sujetarse el proceso de los productos a que se refiere este título.

Art. 199.- Corresponde a los Gobiernos de las entidades federativas ejercer la verificación y control sanitario de los establecimientos que expendan o suministren al público -- alimentos y bebidas no alcohólicas y alcohólicas, en estado natural, mezclados, preparados, adicionados o acondicionados, para su consumo dentro y fuera del mismo establecimiento, basándose en las normas técnicas que al efecto se emitan.

Art. 203.- La Secretaría de Salud, a petición, del titular de la autorización de un producto, permitirá que este pueda ser elaborado por cualquier fabricante, cuando se cumpla con los requisitos consignados al efecto en esta ley y demás disposiciones aplicables.

Art. 205.- El proceso de los productos a que se refiere este título deberá realizarse en condiciones higiénicas sin adulteración, contaminación o alteración y de conformidad con las disposiciones de esta ley y demás aplicables.

Art. 207.- Se considera contaminado el producto o materia prima que contenga microorganismos, hormonas, bacteriostáticos, plaguicidas, partículas radiactivas, materia extraña, así como cualquier otra sustancia en cantidades que rebasen los límites permisibles establecidos por la Secretaría de Salud."

La automatización y expedición de certificados se fundamenta en el Título décimosexto, siendo unicamente de interes para la presente tesis el Capítulo II. Referente a la revocación de autoridades sanitarias.

"Art. 380.- La autoridad sanitaria competente podrá revocar las autorizaciones que haya otorgado, en los siguientes casos:

VI.- Porque el producto objeto de la autorización no se ajuste o deje de reunir las especificaciones o requisitos que fijen esta ley, las normas técnicas y demás disposiciones generales aplicables;

X.- Cuando las personas, objetos o productos dejen de reunir las condiciones o requisitos bajo las cuales se hayan otorgado las autorizaciones."

Por considerarlo de importancia aplicable a la presente fundamentación, el tema de Vigilancia Sanitaria, incluido en el Capítulo Único del Título décimoseptimo de este cuerpo legal:

"Art. 393.- Corresponde a la Secretaría de Salud y, a los gobiernos de las entidades federativas, en el ámbito de sus respectivas competencias, la vigilancia del cumplimiento de esta ley y demás disposiciones que se dicten con base en ella.

Art. 396.- La vigilancia sanitaria se llevará a cabo a través de las siguientes diligencias:

I.- Visitas de verificación a cargo del personal expresamente autorizado por la autoridad sanitaria competente, llevar a cabo la verificación física del cumplimiento de la ley y demás disposiciones aplicables."

A continuación se transcriben algunos de los artículos incluidos en los Capítulos: I, II, y VI del Título decimotavo; todos ellos relativos a las medidas de seguridad, las sanciones aplicables y los delitos en que pueden incurrir -- quienes contravengan lo dispuesto en esta ley:

Cápítulo I.

Medidas de seguridad Sanitaria.

"Art. 402.- Se consideran medidas de seguridad las disposiciones que dicte la autoridad sanitaria competente, de conformidad con los preceptos de esta ley, y demás disposiciones aplicables, para proteger la salud de la población. Las medidas de seguridad se aplicarán sin perjuicio de las sanciones que, en su caso, correspondieren.

Art. 403.- Son competentes para ordenar o ejecutar medidas de seguridad, la Secretaría de Salud y los gobiernos de las entidades federativas, en el ámbito de sus respectivas competencias.

La participación de los municipios estará determinada por los convenios que celebren con los gobiernos de las respectivas entidades federativas y por lo que dispongan los ordenamientos locales.

Art. 404.- Son medidas de seguridad sanitaria las siguientes:

VI.- La destrucción o control de insectos u otra fauna transmisora y nociva.

XIII.- Los demás de índole sanitaria que determinen las autoridades sanitarias competentes, que puedan evitar que se causen o continúen causando riesgos o daños a la salud.

Son de inmediata ejecución las medidas de seguridad - señaladas en el presente artículo.

Art. 414.- El aseguramiento de objetos, productos o sustancias, tendrá lugar cuando se presuma que puedan ser nocivos para la salud de las personas o carezcan de los requisitos esenciales que se establezcan en esta ley. La autoridad sanitaria competente podrá retenerlos o dejarlos en depósito hasta en tanto se determine, previo dictamen de laboratorio acreditado, cual será su destino.

Si el dictamen indicara que el bien asegurado no es nocivo pero carece de los requisitos esenciales establecidos en esta ley y demás disposiciones generales aplicables, la autoridad sanitaria concederá al interesado un plazo hasta de treinta días para que tramite el cumplimiento de los requisitos omitidos. Si dentro de este plazo el interesado no realizara el trámite indicado o no gestionara la recuperación acreditando el cumplimiento de lo ordenado por la autoridad sanitaria, se entenderá que la materia del aseguramiento causa abandono y quedará a disposición de la autoridad sanitaria para su aprovechamiento lícito.

Si del dictamen resultara que el bien asegurado es nocivo, la autoridad sanitaria, dentro del plazo establecido en el anterior párrafo y previa la observancia de la garantía de audiencia, podrá determinar que el interesado y bajo la vigilancia de aquella someta el bien asegurado a un tratamiento que haga posible su legal aprovechamiento, de ser posible, en cuyo caso y previo el dictamen de la autoridad sanitaria, el interesado podrá disponer de los bienes que haya sometido a tratamiento para destinarlos a los fines que la propia autoridad le señale.

Los productos perecederos asegurados que se descompongan en poder de la autoridad sanitaria, así como los objetos, productos o substancias que se encuentren en evidente estado de descomposición, adulteración o contaminación que no lo hagan apto para su consumo, serán destruidos de inmediato por la autoridad sanitaria, la que levantará un acta circunstancial de la destrucción.

Los productos perecederos que no se reclamen por los interesados dentro de las veinticuatro horas de que hayan sido asegurados, quedarán a disposición sanitaria la que los entregará para su aprovechamiento, de preferencia, a instituciones de asistencia social públicas o privadas"

Capítulo II.

Sanciones administrativas.

"Art. 416.- Las violaciones a los preceptos de esta ley, sus reglamentos y demás disposiciones que emanen de ella, serán sancionadas administrativamente por las autoridades sanitarias, sin perjuicio de las penas que correspondan cuando sean constitutivas de delitos.

Art. 417.- Las sanciones administrativas podran ser:

- I.- Amonestación con apercibimiento.
- II.- Multa;
- III.- Clausura temporal o definitiva, que podrá ser parcial o total, y
- IV.- Arresto hasta por treinta y seis horas.

Art. 418.- Al imponer una sanción, la autoridad sanitaria fundará y motivará la resolución, tomando en cuenta:

I.- Los daños que se hayan producido o puedan producirse en la salud de las personas.

II.- La gravedad de la infracción;

III.- Las condiciones socioeconómicas del infractor, y

IV.- La calidad de reincidente del infractor.

Art. 420.- Se sancionará con multa equivalente de diez hasta cien veces el salario mínimo general diario vigente en la zona económica de que se trate, la violación de las disposiciones contenidas en los artículos 75, 121, 127, 142, 147, 149, -- 153, 205, 304, 306, 307, 308, 340, 342, 343, 344, 346, y 413 de esta ley..."

Capítulo VI.

Delitos.

"Art. 463.- A quien adultere, contamine, altere o permita la adulteración, contaminación o alteración de alimentos, bebidas no alcohólicas, bebidas alcohólicas, medicamentos o cualquier otra sustancia o producto de uso o consumo humanos, con inminente peligro para la salud, se le aplicará de uno a nueve años de prisión y multa equivalente a cien o mil días de salario mínimo general, en la zona económica de que se trate."

TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE ANALISIS.

Cuando se pretende investigar el contenido de microorganismos vivos presentes en un alimento, las técnicas y procedimientos de análisis dependen del alimento en cuestión ya que la Secretaría de Salud, establece las técnicas y el procedimiento de análisis así como los microorganismos que deben determinarse - en cada uno de ellos.

En el caso particular de productos lácteos que es el - que nos ocupa las determinaciones microbiológicas, que marca la Secretaría de Salud son: Cuenta de bacterias mesofílicas, aerobias, cuenta de organismos coliformes, número mas probable de - coliformes fecales (NMP), cuenta de hongos y levaduras, cuenta de staphylococcus aureus e investigación de salmonella.

Por ello las técnicas y procedimientos de análisis, -- para productos lácteos son tan diversas, ya que dependen de las determinaciones microbiológicas, anteriormente mencionadas. Y - que a continuación se describe para cada caso en particular.

TOMA DE MUESTRA.

La toma de muestra con fines bacteriológicos, requiere de utensilios y material estéril.

La muestra puede consistir en paquetes o envases originales cerrados, listos para la venta o en muestras tomadas a granel; el tamaño de la muestra no debe ser menor de 100 grs.

Cuando el producto lácteo se encuentre en paquetes o envases originales deberá tomarse el número de paquetes representativos del lote; en muestras a granel o de grandes volúmenes se hará de acuerdo al alimento.

1.- Para leche acidificada y crema, homogeneizar perfectamente y transferir la muestra por medio de cucharas de mango largo o frascos estériles de boca ancha. Colocar inmediatamente las muestras a una temperatura entre 2 y 4 °C, y transportarlos al laboratorio. El análisis debe efectuarse entre 4 y 6 horas después; si no es posible se hará antes de 18 horas.

2.- Para toma de muestra de quesos blandos o semiduros, se tomará una rebanada en forma de cuña, cortada con un cuchillo estéril y haciendo el corte desde el centro del queso. La capa superficial no comestible debe eliminarse antes de transferir el resto al recipiente o bolsa de plástico estériles.

En caso de quesos grandes de consistencia dura es conveniente el uso de un muestreador para quesos, que deberá ser insertado en forma oblicua desde la superficie hasta el centro del queso, penetrando de 10 a 20 centímetros. Colocar las muestras inmediatamente en cajas frías y transportarlas al laboratorio a una temperatura entre 2 y 4°C. Efectuar el análisis dentro de las 24 horas de haber toma la muestra.

3.- Para la toma de muestra de helados, primero se debe remover la capa superficial con una espátula estéril y posteriormente tomar la muestra de diferentes partes, con una cuchara de mango largo o espátula.

En helados estratificados, la muestra debe contener la misma proporción en cada copa como tenga el envase original. - Una vez tomada la muestra, deberá conservarse congelada y nunca dejar que se descongele, transportándola al laboratorio lo mas pronto posible en una caja con hielo seco. Deberá analizar se dentro de las 2 a 6 horas siguientes a la toma.

4.- La toma de la muestra de mantequilla a partir de bloques, puede efectuarse con un muestreador de mantequilla -- que se inserte verticalmente en una esquina. Se pasa la porción a un frasco estéril y se toma otra muestra en la esquina diagonalmente opuesta.

Si no se cuenta con el muestreador, se pueden tomar -- porciones con una cuchara, espátula o cuchillo. La muestra tomada no será menor de 60 grs.

Cuando es necesario el muestreo de superficie, se toma rá la muestra por medio de una espátula o un cuchillo de capa superficial y se transferirá a un frasco estéril de boca ancha.

Las muestras de mantequilla no deben estar en ningún momento en contacto con papel o superficies absorbentes. Se -- transportarán refrigerados y se analizarán lo más pronto posible.

5.- El transporte y conservación de las muestras antes de su llegada al laboratorio, es muy importante para la obtención de resultados confiables.

Durante el transporte, además del uso de recipientes - que tengan la temperatura adecuada para el tipo de muestra, de be cuidarse la integridad de las mismas, principalmente cuando se trate de paquetes individuales pequeños de muestras blandas; evitando que la presión sobre ellas las deforme, las rompa, -- origine derrames o provoque que la muestra se ponga en contacto con el exterior de la envoltura.

PREPARACION DE LA MUESTRA.

1.- Crema o leche acidificada.

Limpiar la superficie de la tapa con un algodón con alcohol al 70 % y quitarla por medio de una pinza, evitando contaminar el interior del recipiente.

Homogenizar la muestra perfectamente con una cuchara de tallo largo o un agitador. Pesar 10 gra., de la muestra en un frasco que contenga 90 ml., de solución amortiguadora de fosfato estéril y a una temperatura de 35 a 40°C, para facilitar la dispersión; esta constituye la dilución 1:10.

2.- Queso.

En condiciones asépticas y usando los utensilios necesarios para cada tipo de queso (cuchillos, espátulas, cucharas, etc.) desmenuzar y mezclar completamente cada muestra, hasta obtener porciones representativas.

Pesar 10 grs., y transferir a un vaso de licuadora o mortero. Agregar 90 ml., de solución diluyente. Homogeneizar; la temperatura de dispersión no debe rebasar los 40°C. La dilución resultante es la 1:10.

3.- Helados y Mantequilla.

Pasar en forma aséptica porciones representativas de helado en un frasco. En el caso de paletas heladas, quitar con mucho cuidado el papel y con una espátula, separar el helado del palito dentro de un frasco estéril. Colocar el frasco en un baño de agua a 45°C por no más de 15 minutos. Pesar 10 grs., de la muestra extrayéndola con una pipeta estéril,

agregar 90 ml., del diluyente y agitar. Esta constituye la solución 1:10.

En caso de la mantequilla, quitar con mucho cuidado la envoltura, evitando contaminar el producto con el exterior de la misma. Pasarla a un frasco estéril y colocarla a baño - maría hasta su fusión. Transferir 10 ml., de la mantequilla - fundida a 90 ml. de solución amortiguadora calentada a 45°C.

La transferencia se efectúa con una pipeta caliente, introduciéndola en el frasco de dilución en baño maría, para ayudar al deslizamiento de la mantequilla por la pipeta. La dilución resultante es de 1:10.

Alternativamente, se puede preparar esta dilución - tomando una porción de 50 grs. de mantequilla. (Con una humedad aproximadamente del 8 %) y agregando 42 ml. del diluyente.

Calentar a baño maría hasta la fusión de la mantequilla, agitar bien y dejar reposar por no mas de 15 minutos; 10 ml. de la solución equivalente a 1 gr., de mantequilla. La fusión se efectua a 45°C.

PREPARACION DE LAS DILUCIONES DECIMALES.

Independientemente del grupo de microorganismos que se pretenda enumerar, el procedimiento de la preparación de las diluciones deberá realizarse con apego a las directrices que se describen a continuación. Ya que el incumplimiento de estas condiciones dará lugar a variaciones importantes en los resultados, hasta el punto de resultar inutilizables. Y de esta manera no es posible comparar los resultados, entre dos laboratorios que trabajan la misma muestra, con un manejo diferente de preparar las diluciones, ni es posible interpretar los resultados sucesivos de un laboratorio, si no se lleva a cabo la técnica que a continuación se describe:

a).- Para preparar la primera dilución se toman 10 gr. o 10 ml., de muestra, y se colocan en un frasco estéril que contenga 90 mls. de solución diluyente, como se indicó para cada tipo de lácteo en preparación de la muestra.

Agitar la primera dilución 25 veces en 7 segundos, -- haciendo un arco de 30 cms.; de arriba a abajo. Es importante -- efectuar la agitación siempre de la misma manera, para obtener resultados comparables.

Al realizar la segunda dilución, tomar con una pipeta estéril 10 mls; de la dilución 1:10 y transferirlo a un frasco con 90 mls; de solución amortiguadora de fosfatos. Agitar en la misma forma en que se indicó anteriormente.

Si se requiere continuar las diluciones de la muestra seguir los pasos que ilustran los esquemas I y II según convenga.

Para aforar el líquido de la pipeta, deberá aplicarse la punta de esta en el interior del cuello y mantenerla en - -

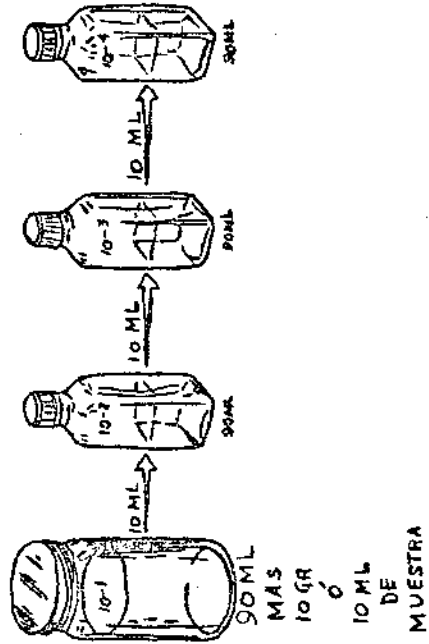
posición vertical, por lo que el frasco deberá inclinarse.

Hacer las diluciones decimales subsecuentes, utilizando una pipeta para cada una.

El volúmen que se trasfiere no deberá ser menor del 10 % de la capacidad total de la pipeta.

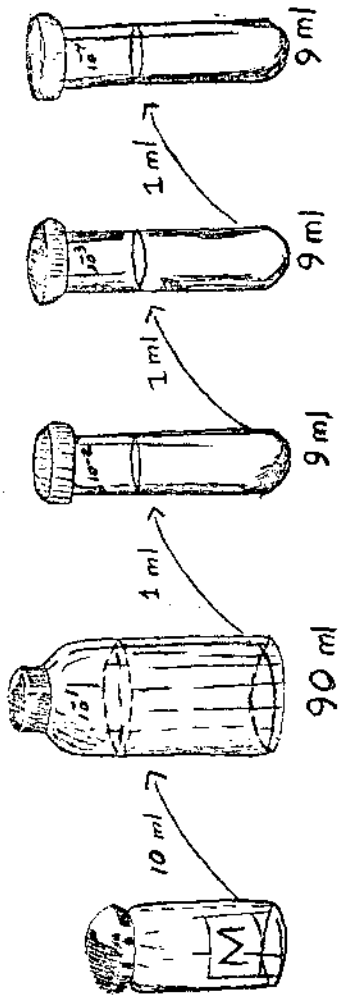
ESQUEMA No 1

PREPARACION DE DILUCIONES.



ESQUEMA No. II

PREPARACION DE DILUCIONES.



Volumen del
diluyente

CUENTA DE BACTERIAS MESOFILICAS AEROBIAS.

Dentro del grupo de bacterias mesofílicas aerobias - encontramos una amplia variedad de microorganismos, que tienen una capacidad de proliferar entre los 20 y 37°C.

Dependiendo del producto, podemos encontrar entre la flora mesofílica aerobia, bacilo, cocos, las formas intermedias, Grampositivas y Gramnegativas, aisladas o agrupadas en todas - las variedades.

Desde el punto fisiológico de su patogenicidad también es posible encontrar un amplio mosaico de especies y otros grupos tales como: cromógenos, proteolíticos, fermentativos, lipolíticos, psicrotróficas, termodúricos, patógenos, saprófitos, - etc.

La cuenta de bacterias mesofílicas aerobias, se utiliza en los productos lácteos como:

- 1.- Indicador de las condiciones de higiene en que ha - sido manejado el producto.
- 2.- Indica la idoneidad de un ingrediente crudo que se va a incorporar a la materia prima.
- 3.- Para determinar la eficiencia del proceso de preservación.
- 4.- Como indicador del valor comercial.

Esta cuenta se aplica a crema, helados, quesos fundidos y para untar; mantequilla de mesa que no han sido adicionadas de cultivos lácteos. No se efectúa en quesos, leches y cremas ácidas o mantequillas en las que se han utilizado en su elaboración diversos cultivos lácteos.

TECNICA .

La técnica mas utilizada es la de recuento sobre vaciado en placa, cuando se pretende investigar el contenido de microorganismos vivos; su fundamento consiste en contar, las colonias que desarrollan en el medio selectivo, después de cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo en la muestra bajo estudio.

La técnica admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores.

Dicha técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes. Ya que la variedad de especies y sus distintas necesidades nutricionales, temperatura y atmósfera, hace que el número de colonias que se manifiesten constituyen una estimación de la cifra realmente presente.

No obstante las condiciones adversas señaladas para su desarrollo, pueden llegar a ser lo bastante reproducibles para dar significado a los resultados que se obtienen.

PROCEDIMIENTO:

Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo, de manera que su inoculación, la adición de los medios de cultivo y su rotación se puedan realizar cómoda y libremente. - - Marcar las cajas en sus tapas con los datos pertinentes a su inoculación.

Para la preparación y dilución de la muestra seguir - las indicaciones señaladas en las páginas 30, 31, 32 y 33.

Practicar las diluciones decimales que se estimen convenientes de acuerdo con los esquemas I y II.

Usando diferentes pipetas para cada dilución decimal, - transferir un ml. de cada una a cajas de Petri, previamente identificadas como se ilustra en los esquemas III y IV según convenga. Aplicando la punta de la pipeta al fondo de la caja, mientras escurre el líquido. Al realizar esta maniobra evitar todo tipo de contaminación.

Agregar de 12 a 15 ml. de agar treiptona extracto de levadura fundido y mantenido a temperatura de 45 - 48°C en baño de agua. Mezclarlo con la muestra (6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante) sobre una superficie lisa y horizontal y cuidando que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar.

Preparar una caja sin inocular para cada frasco de medio empleado, como control de esterilidad.

El tiempo transcurrido desde el momento que la muestra se incorpora al diluyente, hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no excederá de 20 minutos.

Incuban las cajas en posición invertida a 35°C, durante 48 horas.

Se seleccionan aquellas cajas donde aparezcan entre 30 y 300 colonias para efectuar el recuento, ya que en estas es menor el error.

Se cuentan todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de hongos) incluyendo las puntiformes. Cuando estas formas de colonias se confunden con pequeñas partículas de alimento, se recurre al microscopio para resolver estos casos.

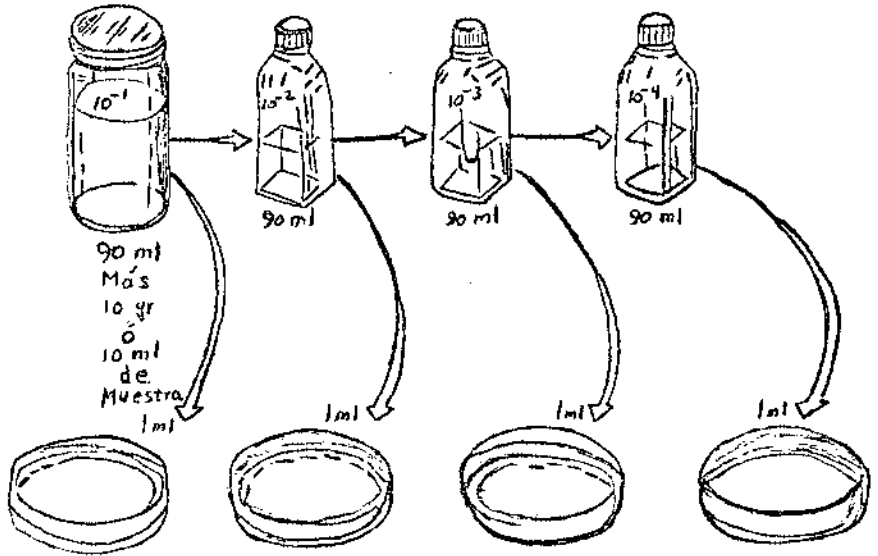
Si el número de colonias se estima mayor de 300, y no se dispone de placas preparadas con las diluciones subsecuentes, se cuenta en la mitad o en un cuarto representativo de ella y posteriormente se multiplica por 2 o por 4 el número obtenido.

Finalmente el número de colonias obtenidas se multiplica por la inversa de la dilución, para obtener el número total de colonias.

Reportar: Cuenta de colonias de bacterias mesofílicas / g o ml., en placas de agar triptona extracto de levadura incubadas a 48 hrs. por 35°C.

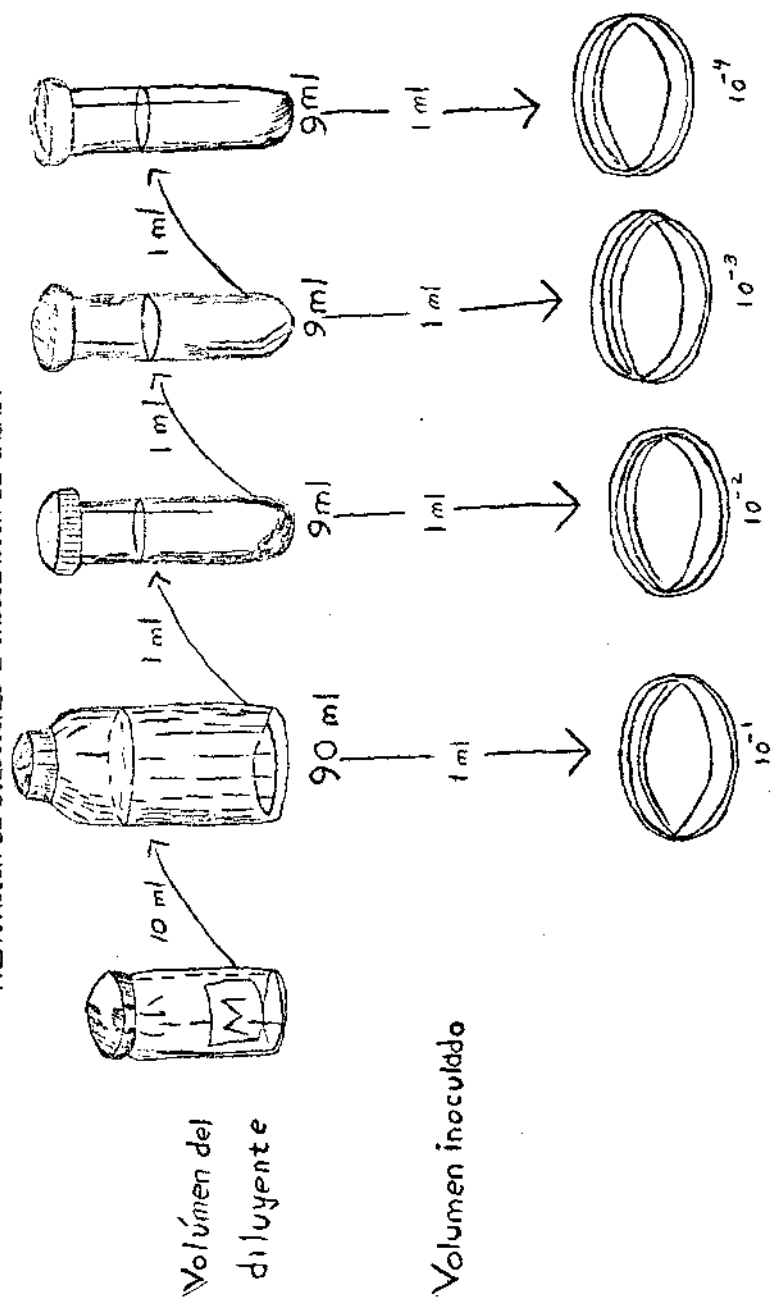
ESQUEMA No. III

PREPARACION DE DILUCIONES E INOCULACION DE CAJAS:



ESQUEMA No. IV

PREPARACION DE DILUCIONES E INOCULACION DE CAJAS:



CUENTA DE ORGANISMOS COLIFORMES.

La definición mas completa de este grupo se describe - como: bacterias aeróbias o facultativamente anaerobias, bacilos cortos Gram negativos no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 hrs. de incubación a 32 - -- 35°C.

Este grupo de microorganismos esta constituido por los géneros: Escherichia, Esterobacter, Klebsiella y Citrobacter, - pertenecientes a la familia Esterobacteriaceas. Siempre presentes en la materia fecal del hombre y animales superiores, aunque tambien las podemos encontrar en el suelo y los vegetales.

Se les reconoce también como Psicofilicas por desarrollarse a temperaturas menores de 10°C., pero a temperaturas de - 40°C o menores impide su proliferación y eventualmente entran en actividad. Siendo considerable su muerte a 12°C menor a -18°C. e insignificante a -40°C, después de 12 meses.

Su desarrollo se vé muy limitado por concentraciones sa linas superiores al 6% y en general por la actividad de el agua (Aw), bajo cifras menores de 0.935 ó de 0.935 son inhibitorias - para Esterobacter aerogenes y Escherichia coli respectivamente.

Un pH por debajo de 4.8, en algunos alimentos se traduce con una caída en el número de coliformes.

Por ser bacterias no termodúricas son incapaces a sobre vivir a los tratamientos de pasteurización lo que constituye una de las bases para su empleo como indicador de prácticas no higié nicas en el manejo de los alimentos, que se elaboran con materia prima pasteurizada como en el caso de los productos lácteos.

Esta cuenta se aplica a todos los alimentos lácteos fres cos.

TECNICA.

La presencia y el recuento de organismos coliformes en productos lácteos, se determina mediante la técnica de vaciado en placa. A través del empleo de un medio sólido que favorece selectivamente y los diferencia de los microorganismos, con los que suelen encontrarse asociados en el alimento.

El criterio para seleccionar esta técnica se basa en la densidad de gérmenes que se espera encontrar, debido a la composición y naturaleza del producto.

PROCEDIMIENTO:

Inocular 1 ml de cada dilución decimal a una caja Petri (ver esquema III ó IV) utilizando pipetas diferentes; esta operación se puede realizar al mismo tiempo que la cuenta de bacterias mesofílicas aerobias, número mas probable de coliformes fecales (MNP) y cuenta de hongos y levaduras.

Si se espera encontrar cifras de coliformes menores de 20 por gr. o ml., deposita 5 ml, de la dilución 1:10 en cajas - de Petri, 2.2 y 1 ml. respectivamente o distribuir 10 ml. en 3 cajas.

Agregar de 12 a 15 ml. de agar rojo violeta bilis y homogeneizar como se indicó en cuenta de bacterias mesofílicas - aerobias. Dejar solidificar.

Agregar 4 a 5 ml. de medio sobre la superficie y distribuirlo con movimientos laterales, para que cubra toda la superficie. Dejar solidificar.

Incubar las cajas en posición invertida de 32 - 35°C, - durante 24 horas.

Seleccionar las cajas que contengan entre 20 y 200 colonias.

Contar como coliformes las colonias de 0.5 a 2 mm. de diámetro de color rojo oscuro, que exhiban un halo de precipitación típico de color rojo claro o rosa.

Realizar el cómputo de las colonias tomando en cuenta la dilución y el volúmen sembrado.

En caso de haber inoculado 10 ml. en 3 cajas, sumar las colonias que aparezcan en las 3.

Si se sembraron 5 ml., sumar las colonias que aparezcan en las 3 cajas y multiplicar por 2, para obtener el número de colonias por gramo o mililitro.

Reportar: Cuenta de colonias de organismos coliformes - por g o ml.

NUMERO MAS PROBABLE DE COLIFORMES FECALES (NMP).

El grupo de coliformes fecales queda definido en función de la capacidad que exhiben algunos coliformes para desarrollarse y realizar algunas actividades bioquímicas a temperatura elevada; por lo que no incluye una determinada especie, aunque la más prominente, se presume que corresponde a la *E. coli*.

Son también bacterias no termodúricas, susceptibles a la congelación y descongelación, desecación y acidez excesiva.

E. coli tiene una limitada capacidad psicotrónica y es incapaz de proliferar a una concentración de NaCl, por encima de 6% aparentemente el germen se conduce bastante bien, fuera del intestino y es capaz de multiplicarse activamente en los alimentos, cuando se le conceden las facilidades necesarias; su capacidad metabólica es muy amplia, e incluso se ha demostrado que puede degradar insecticida como el lindano en un medio de cultivo.

Esta determinación puede aplicarse a helados de nuez, coco, fresa y otras frutas naturales; quesos frescos y preparados con condimentos.

TECNICA

La técnica que se realiza en el laboratorio para la -- identificación de coliformes fecales en los productos lácteos, es la de recuento en tubo por dilución; que consiste en hacer una estimación de la densidad de bacterias. Ya que se considera que la concentración de este grupo de microorganismos si -- está presente debe ser mínima, esta técnica para determinar so lo el grupo de coliformes fecales se basa en los siguientes me canismos: el uso de agentes químicos inhibidores y la incuba-- ción a temperaturas elevadas de 44.5°C.

La estimación que se realiza mediante esta técnica tie-- ne una base estadística: la probabilidad de obtener tubos de -- cultivo positivos, disminuye conforme es menor el volúmen de -- muestra inoculada.

El método admite diversas fuentes de error, en particu-- lar la heterogeneidad en la distribución de los microorganis-- mos en la muestra y en sus diluciones.

En base a ello se diseñaron las tablas llamadas del nú mero mas probable en las que se expresa la concentración de -- gérmenes que corresponden a cada combinación de tubos positi-- vos, permitiendo obtener los valores buscados.

Para tener un valor probabilístico las cifras consigna-- das en las tablas, constituyen la mejor estimación que puede -- hacerse del número de bacterias en la muestra original. Indi-- cando sin embargo, los límites que con probabilidad de 95% pue-- de esperarse en cada caso, (ver tabla I).

PROCEDIMIENTO.

Se selecciona la serie de tubos por utilizar que en -- este caso es la 3, 3, 3, con diluciones. Preparar y diluir la muestra como se indica en las páginas 30, 31, 32 y 33.

1.- Prueba presuntiva:

A los nueve tubos que contienen cada uno 10 ml., de -- caldo lauril sulfato triptosa y campana de fermentación, mar-- car 3 a la primera dilución, 3 a la segunda dilución y 3 a la tercera dilución.

Transferir por triplicado 1 ml. de cada una de las di-- luciones decimales a los tubos identificados previamente: (ver esquema No. V).

Incubar a 35°C durante 48 hrs.

Despues de este periodo de incubación, la presencia de gas en cualquier cantidad en las campanas de fermentación, -- hace positiva la prueba y remite los tubos a prueba confirma-- toria.

2.- Prueba confirmatoria.

Agitar suavemente los tubos que resultaron positivos; resemar una asada de cada uno a un tubo que contenga caldo -- EC, de la prueba confirmatoria. Al efectuar esta resiembra -- sostener el tubo primario (prueba presuntiva) en un ángulo tal que se pueda tomar la asada evitando la película que pudiera existir en el medio. Sacar el asa del líquido en sentido per-- pendicular a su superficie, de manera que se forme un menisco bien definido, (ver esquema No. VI).

Incubar los tubos en un baño maría, con agitación - - constante a una temperatura de $44.5 \pm 0.05^{\circ}\text{C}$, durante 24 ± 2 hrs. Considerar la prueba positiva, si hay formación de gas en cualquier cantidad.

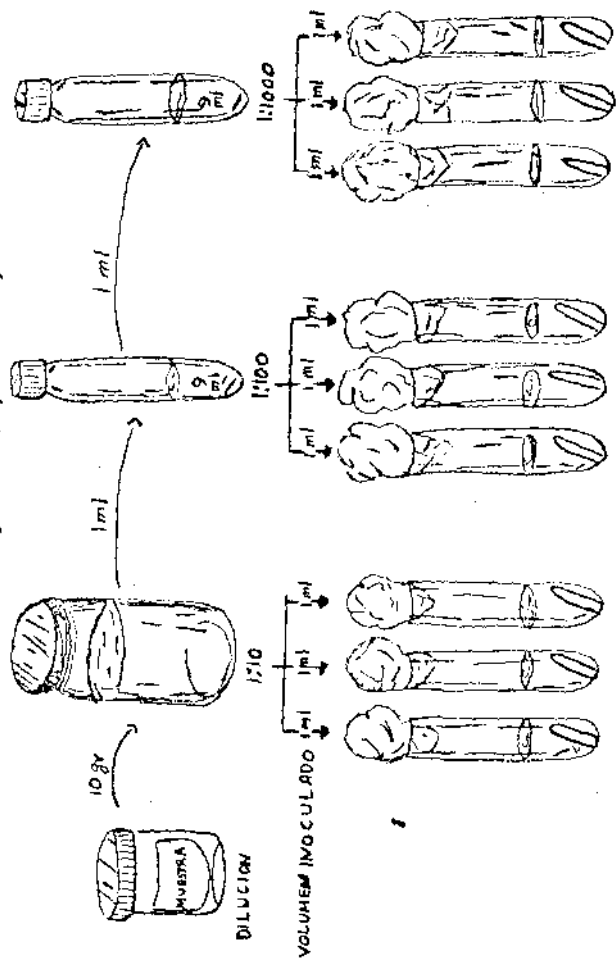
(1) Para productos lácteos las diluciones utilizadas - son 1:10, 1:100 y 1:1000.

Buscar en la tabla 1, la combinación que corresponda - al número de tubos positivos.

Reportar: como NMP de coliformes fecales por gr.

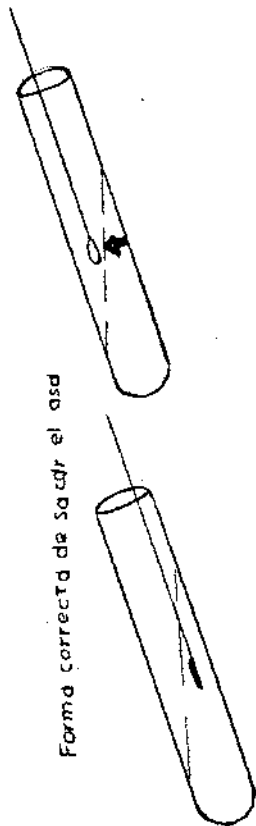
ESQUEMA No. V

RECuento DE MICROORGANISMOS POR DILUCION EN TUBO
PRUEBA PRESUNTIVA
Serie 3(1:10), 3(1:100), 3(1:1000)



EXTRACCION DEL INOCULO DEL CALDO PRESUNTIVO.

Forma correcta de sacar el asa



Forma incorrecta de sacar el asa

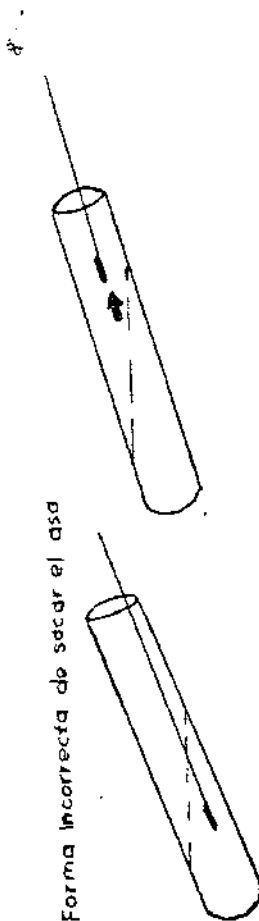


TABLA No. 1

NUMERO MAS PROBABLE DE ORGANISMOS

Tubos inoculados: 3 con 1 ml dilución 1:10 == 0.1 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:100 == 0.01 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:1,000 == 0.001 g muestra

Tubos Positivos			NMP/g	Tubos Positivos			NMP/g	Tubos Positivos			NMP/g	Tubos Positivos			NMP/g
3	3	3		3	3	3		3	3	3		3	3	3	
(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.001)	
0	0	0	3.0	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23.0
0	0	1	3.0	1	0	1	7.2	2	0	1	14.0	3	0	1	39.0
0	0	2	6.0	1	0	2	11.0	2	0	2	20.0	3	0	2	64.0
0	0	3	9.0	1	0	3	15.0	2	0	3	26.0	3	0	3	95.0
0	1	0	3.0	1	1	0	7.3	2	1	0	15.0	3	1	0	43.0
0	1	1	6.1	1	1	1	11.0	2	1	1	20.0	3	1	1	75.0
0	1	2	9.2	1	1	2	15.0	2	1	2	27.0	3	1	2	120.0
0	1	3	12.0	1	1	3	19.0	2	1	3	34.0	3	1	3	160.0
0	2	0	6.2	1	2	0	11.0	2	2	0	21.0	3	2	0	93.0
0	2	1	9.3	1	2	1	15.0	2	2	1	28.0	3	2	1	150.0
0	2	2	12.0	1	2	2	20.0	2	2	2	35.0	3	2	2	210.0
0	2	3	16.0	1	2	3	24.0	2	2	3	42.0	3	2	3	290.0
0	3	0	9.4	1	3	0	16.0	2	3	0	29.0	3	3	0	240.0
0	3	1	13.0	1	3	1	20.0	2	3	1	36.0	3	3	1	460.0
0	3	2	16.0	1	3	2	24.0	2	3	2	44.0	3	3	2	1,100.0
0	3	3	19.0	1	3	3	29.0	2	3	3	53.0	3	3	3	3+1,100.0

CUENTA DE HONGOS Y LEVADURAS.

Aunque en realidad taxonomicamente las levaduras son hongos, en la microbiología sanitaria suelen designarse por se parado.

Los hongos y las levaduras son microorganismos que tienen interés como causa de alteración y como elementos biológicos, utilizadas en la manufactura de algunos alimentos como: quesos, cerveza, pan, etc.

Ciertos hongos pueden producir al desarrollarse en el alimento, toxinas con efecto en los alimentos y el hombre, las que genericamente reciben el nombre de micotoxinas. Los hongos tienen gran abundancia en la naturaleza, siendo muy comunes en el polvo y la tierra; las levaduras se desarrollan con facilidad en los utensilios y equipos defectuosamente lavados, que se utilizan en industrias que manejan carbohidratos.

Esta determinación se aplica a quesos, (con excepción de aquellos que han sido madurados con hongos) mantequillas y leches acidificadas; se puede aplicar a helados hechos con frutas naturales o nueces.

TECNICA

El propósito primario de su investigación en el laboratorio consiste en descubrir la exposición a fuentes de contaminación y defectuosa conservación de algunos alimentos. Para ello, la técnica que se ha diseñado es la de vaciado en placa con el fin de estimar su abundancia, y no solo su presencia. El investigar cepas toxigénicas carece hasta el momento, de valor práctico.

La prueba no se aplica a cualquier tipo de alimento, sino solo en aquellos en los que de acuerdo con la experiencia, permiten correlacionar su hallazgo por encima de ciertos límites, con prácticas sanitarias defectuosas en la producción y almacenamiento del alimento.

PROCEDIMIENTO.

Preparar la muestra y las diluciones como se indica en las páginas 30, 31, 32 y 33.

Inocular 1 ml. de cada dilución a cajas de Petri; se puede efectuar al mismo tiempo que se inoculan las cajas para cuenta de mesofílicos aerobios y coliformes.

Añadir 12 - 15 ml. de agar papa dextrosa fundido, enfriado y acidificado con ácido tartárico como se indica en la página 91 en la preparación del medio.

Dejar solidificar e incubar las cajas en posición invertida a 22°C.

Revisar las cajas a los 3 días, y contar las colonias que aparezcan debido a que hay colonias de hongos, que se desarrollan profundamente y enmascaran el resultado.

Si no hay crecimiento, incubar 2 días más.

Contar el número de colonias de hongos y levaduras, multiplicar por la inversa de la dilución.

Reportar el número de colonias de hongos por gr. o ml., y número de colonias de levaduras por gr. o ml. del producto.

CUENTA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

FISIOLOGIA.

Este microorganismo pertenece a la familia Micrococcaceae, son cocos Gram positivos, casi perfectos en la forma esférica y llegan a medir de 0.5 a 1 μ de diámetro, y aparecen agrupados en forma de racimo, formando parejas en agrupaciones pequeñas. Son aerobios y anaerobios facultativos, y sus necesidades son satisfechas fácilmente, por medios orgánicos inertes, incluso por inorgánicos, aunque se han descrito formas - móviles son casi invariablemente inmóviles.

pH.

Los límites en que puede desarrollarse esta bacteria son relativamente estrechos entre 4.8 y 7.6, por ello crecen - mejor en alimentos neutros o cercanos a la neutralidad.

ACTIVIDAD DEL AGUA.

La mínima actividad de agua es de 0.86 a 0.90, que - permite el crecimiento de S. aureus. Pueden crecer a niveles de sal altos, la mayoría crece a un 10% de NaCl, siendo algunos capaces de crecer en 20%.

TEMPERATURA.

Se multiplican a temperaturas entre 10 y 45°C, en - alimentos contaminados con pequeñas cantidades de S. aureus, se neutraliza la posibilidad de formación de toxina cuando el producto se refrigera por debajo de 10°C. o se calienta por - encima de 60°C, hasta el momento de su consumo.

Aunque el microorganismo es destruido fácilmente por el calor de la pasteurización y los métodos normales de la cocción, la toxina que produce es más resistente al calor; es destruido gradualmente mediante ebullición durante 30 minutos como mínimo. Pudiendo seguir activa mediante un cocinado ligero.

ACTIVIDAD BIOQUIMICA.

Licúa la gelatina, reduce los nitratos a nitritos y amoníaco, no hidroliza el almidón, generalmente fermentan la lactosa, sacarosa, maltosa, glicerol, manosa, fructuosa y el manitol. No fermentan dulcitol, L-xilosa, ramnosa, L-arabinosa, D-sorbitol, celobiosa y dextrina, congula el plasma sanguíneo.

Se considera que la fermentación de manitol tiene significado diferencial porque lo hacen fermentar la mayor parte de las cepas conglulasa positiva.

La importancia de investigar la presencia de *S. aureus* en los productos lácteos, se debe a que este microorganismo es patógeno para el hombre, ya que algunas cepas tienen la capacidad de producir una enterotoxina, cuya principal característica es la de coagular el plasma.

Es un microorganismo parásito de los animales superiores y del hombre, considerando a este la fuente de contaminación más importante de *S. aureus* para los alimentos, ya que se ha comprobado que aproximadamente el 40% de las personas adultas normales, albergan estos microorganismos en la nariz y garganta, por ello las yemas de los dedos están frecuentemente contaminadas por esta bacteria.

Es muy común encontrarla en las heridas, y multiplicarse rápidamente debido a la humedad, que proporciona el fluido seroso que recubre siempre las heridas, por lo que si se utilizan las manos para mezclar los ingredientes, de individuos que presentan pequeñas erosiones en ellas y que a veces son de carácter supurativo, al manipular el alimento pueden añadir a este millones de células de *S. aureus*.

La contaminación puede tener lugar en los productos lácteos. Si el animal de donde proviene la leche sufre alguna infección piógena.

El *S. aureus* puede crecer en grandes cantidades en los alimentos sin presentar cambios en el olor, sabor o aspecto físico, de tal forma que el consumidor no ve ningún signo sospechoso en el alimento.

El encontrar sepas de *S. aureus* coagulosa positivo, tiene significado cuando se encuentran de 100 y de 1000 por gramo o mililitro. Determinándose una intoxicación alimentaria

cuando se encuentran de 100,000 000 por gramo o ml. de alimento.

Esta determinación se aplica en los productos lácteos tales como: cremas pasteleras, quesos , principalmente frescos, postres preparados a base de leche como flanes, gelatinas, o na tillas. En helados, solamente en una posible intoxicación cuando se sospeche que la proliferación haya tenido lugar antes de congelar la mezcla.

TECNICA.

Existen varias técnicas para el recuento de *Staphylococcus aureus* conglulasa positiva, siendo reconocida unicamente como oficial la Técnica de Baird - Parker, ya que el recuento se efectúa directamente en placa, por siembra en superficie. - Teniendo esta técnica mayor aceptación por su especificidad, - y porque arroja cifras mas reproducibles.

PROCEDIMIENTO.

1.- Cuenta de *Staphylococcus aureus*.

Preparación y dilución de la muestra. Consultar las páginas 30, 31, 32 y 33.

Utilizando diferentes pipetas de 1 ml. para cada dilución, depositar 0.1 ml., sobre la superficie de placas de agar Baird - Parker preparadas como se indica en la página 96 y 97.

Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar, con varillas estériles de vidrio dobladas en ángulo recto, - utilizando una para cada dilución.

Mantener las placas en su posición, hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.

Invertir las placas e incubar 45 - 48 horas a 35°C.

Seleccionar las placas que tengan entre 20 y 200 colonias típicas de *S. aureus*; si no es posible seleccionar las placas, de diluciones mas altas aunque tengan mas de 200 colonias.

Las colonias típicas son: negras, circulares, brillantes, convexas de 2 a 3 cm. de diámetro, con o sin ligero borde blanco, y rodeadas por una zona clara en el fondo del medio opaco.

Para realizar las pruebas de coagulasa y termonucleasa, seleccionar el número de colonias de acuerdo al siguiente cuadro:

Número de colonias Sospechosas en la placa.	Colonias a probar.
Menos de 50	3
51 a 100	5
101 a 200 o más	7

Sembrar el número de colonias de acuerdo con el cuadro, en 0.5 ml. de caldo infusión cerebro corazón.

Incubar a 35°C, durante 24 horas.

Después del periodo de incubación, pasar con una pipeta de 1 ml. 0.3 ml. de cada cultivo a otro tubo de 10 X 75 mm y conservarlo para la prueba de termonucleasa. El resto del cultivo se usará para la prueba de coagulasa.

2.- Prueba de coagulasa.

Agregar a los 0.2 ml. de cultivo anterior (caldo infusión cerebro corazón) 0.2 ml. de plasma de conejo diluido, volumen a volumen con solución salina estéril.

El plasma deberá obtenerse usando como anticoagulante - solución de EDTA al 2%.

Incubar en un baño de agua de 35 a 37°C, y observar a las 24 horas. Considerar positiva la prueba si hay formación de coágulo.

3.- Prueba de termonucleasa.

La producción de nucleasa termoestable es una propiedad de la mayoría de las cepas de *S. aureus*. La prueba es rápida y sencilla para la confirmación de este microorganismo.

En un portaobjetos limpio, agregar 3 ml. de agar azul de toluidina DNA fundido. Esparciarlo por toda la superficie.

Hacer perforaciones de 2 mm. de diámetro con una pipeta Pasteur.

Calentar durante 15 minutos los tubos que contienen -- los 0.3 ml. de cultivo en caldo infusión cerebro corazón, en baño de agua hirviendo.

Colocar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a los orificios del medio.

Incubar en cámara húmeda durante 4 a 24 horas a 35°C.

La aparición de un halo color de rosa alrededor de la perforación se califica como positivo.

Hacer el cálculo del contenido de microorganismos en el producto tomado en cuenta, el número de colonias totales, el número de colonias confirmadas, la dilución y el volúmen inoculado (0.1 ml.).

Ejemplo: si la caja tiene 148 colonias en la dilución - 1:10000.

Se tomaron 7 colonias para la prueba. si de esta dan 5 positivas el cálculo será:

$$\frac{148 \times 5}{7} = 105 \text{ (redondeando)} = 100 \times 100000 = 10,000 \text{ 000}$$

Reportar: cuenta de colonias de S. aureus por gr o ml. - de alimento.

INVESTIGACION DE SALMONELLA.

Este importante género de bacterias pertenece a la familia Enterobacteraceae y a la tribu Salmonellae, aproximadamente comprende 1,800 serotipos diferentes, a este grupo pertenecen los agentes productores de la fiebre tifoidea y paratifoidea, así como los causantes de la salmonelosis humana transmitida por los alimentos.

El género Salmonella es el microorganismo más extensamente estudiado entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos, debido a la elevada incidencia del padecimiento, a que dá lugar, a su sinigual ecología y factores que la determinan, a la versatilidad de perfiles serológicos entre sus miembros y a la abundancia del material disponible en la literatura que estimula a la investigación con nuevos enfoques de técnicas para su aislamiento e indentificación y en general hacia métodos de estudio y control epidemiológico mas eficientes de la salmonelosis.

MORFOLOGIA.

Las salmonelas son bacterias móviles que se desarrollan en aerobiosis, pero pueden hacerlo también en condiciones de anaerobiosis, son bacilos Gram negativos, cortos y gruesos que miden de 0.5 a 0.8 μ de diámetro y de 1 a 3.5 μ de longitud.

TEMPERATURA.

Su temperatura óptima de desarrollo es de 37°C y pueden hacerlo dentro de amplios márgenes, desde unos 6.7°C, con largo tiempo de generación en algunos alimentos hasta 45.6°C, a temperatura ambiente (18 - 25°C), manteniendo su multiplicación a buen ritmo, a 10°C la velocidad de crecimiento disminuye

es necesario reducir la temperatura por debajo de 6.7°C , para que el crecimiento cese por completo. La *Salmonella* se destruye por el calor a 55°C .

pH.

El pH óptimo se encuentra en valores alrededor de la neutralidad, comportándose como bacteriostáticos, valores superiores a 9 e inferiores a 4.

ACTIVIDAD DEL AGUA.

El óptimo de actividad del agua (A_w) para el desarrollo de las *Salmonellas* es aproximadamente de 0.99. La A_w mas baja -- que aún permite el desarrollo de la salmonela en medio de laboratorio es alrededor de 0.945 (equivalente a una solución de cloruro de sodio al 9 %).

Estos gérmenes no muestran capacidad para proliferar en presencia de concentraciones salinas moderadas. Sin embargo, la temperatura ejerce una moderada influencia en la tolerancia de sal por parte de las salmonelas.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS.

No utiliza el malonato de sodio, no desarrollan en presencia de cianuro, no produce ureasa, no licua la gelatina y de carboxilan la arginina, la ornitina y la lisina. Producen ácido en el medio de tartrato de Jordan. No fermenta la sacarosa, la salicina, la rafinosa o la lactosa.

Fermenta el dulcitol, el inositol y la glucosa.

La fermentación de azúcares generalmente se acompaña de producción de gas.

TECNICA.

El aislamiento de estos gérmenes requiere el empleo de técnicas que difieren según sea la composición del alimento, el tratamiento al que ha estado sujeto durante su procesamiento y la carga microbiana del producto final, ya que la contaminación de estos gérmenes va acompañada del ingreso de otras enterobacterias que pueden llegar a inhibirlas. Por ello no es posible recomendar exclusivamente un medio de cultivo para su aislamiento.

La literatura registra grán diversidad de medios de cultivo, técnicas de preenriquecimiento y enriquecimiento y sugiere diversos volúmenes de muestra para realizar el análisis.

En el presente trabajo se describe la técnica oficial que maneja la Secretaria de Salud, para la identificación de *Salmonella* en productos lácteos.

PROCEDIMIENTO.

1.- Preenriquecimiento:

Pesar 25 grs. de la muestra y homogeneizar con 225 ml de agua peptonada; en el caso de quesos, se utiliza agua peptonada con fosfatos para neutralizar la acidez y licuar si fuera necesario durante 1 - 2 minutos.

Incubar a 35°C por 24 horas.

2.- Enriquecimiento:

Agitar los frascos y pasar 1 ml del cultivo anterior - a un tubo con 10 ml de caldo tetracionato enriquecido ver páginas 100 y 101 y 1 ml., a otro tubo con 10 ml de caldo selenito cis tina.

Incubar a 43°C, por 24 horas.

3.- Aislamiento:

Agitar suavemente los tubos del cultivo anterior y por medio de una asa, sembrar por estría de manera de obtener colonias aisladas, sobre la superficie de cuando menos 2 placas de medio diferenciales selectivos por cada tubo.

Los medios diferenciales pueden ser: Agar Verde Brillante, Agar Sulfito de Bismuto, Agar XLD y Agar SS.

Incubar a 35°C, por 24 horas.

Observar los cultivos para identificar las colonias -- sospechosas de acuerdo a los medios seleccionados.

Agar Verde Brillante.

Las colonias de salmonela dado que no fermentan la lactosa ni la sacarosa, tiene un color rojo o rosa, rodeadas de -- medio rojo. Las colonias fermentadoras de la lactosa presentan colonias amarillas.

Agar Sulfito Bismuto.

Presentan colonias negras con o sin brillo metálico, - rodandas de un halo café, que posteriormente se torna negro. En ocasiones las colonias pueden ser de color café. Esta coloración se debe a que la mayoría de las salmonelas son capaces de reducir el sulfato y el sulfito a sulfuro.

Agar XLD.

Las colonias de Salmonella son de color rojo debido a la descarboxilación de la lisina que produce una alcalinización del medio. Y presentan generalmente centro negro por producción de H_2S . Los fermentadores de la lactosa y sacarosa producen colonias amarillas. El desoxicolato se agrega para prevenir la - proliferación del Proteus.

Agar SS.

Las colonias son traslúcidas, transparentes u opacas, algunas veces con centro negro. Las colonias de los fermentadores de la lactosa son rojas.

4.- Identificación Bioquímica:

Seleccionar por lo menos dos colonias típicas sospech_o sas de cada placa, que se encuentren bien aisladas.

Tocar con una asa recta cada colonia e inocular dos - tubos, uno con agar triple azúcar y hierro (TSI) y otro con -- agar hierro lisina (LIA), por estría en la superficie inclinada y por picadura en el fondo (ver páginas 94,95 y 96)

Incubar a 35°C, por 24 horas.

Observar el crecimiento en los tubos y considerar presuntivamente positivas las colonias que den las siguientes reacciones.:

Agar TSI. En la columna vertical se observa: vire del medio a color amarillo debido a la fermentación de la glucosa; y en la parte inclinada del medio se intensificará el color rojo por la no fermentación de la lactosa o sacarosa. En la mayoría de los casos se observa coloración negra a lo largo de la - picadura, debido a la producción de H₂S.

Agar LiA. Se observa una coloración púrpura tanto en - la columna vertical como en la superficie inclinada, debido a la descarboxilación de la lisina, en ocasiones se observa la pro-- ducción de H₂S, con ennegrecimiento a lo largo de la picadura.

Si uno de los tubos da reacciones típicas y otro no, - si las reacciones fueron típicas o existe alguna duda, se recurre a otras pruebas bioquímicas tales como: Ureasa, IMVIC (Indol, Roj de Metilo; Voges Proskauer y Citrato) y para la dife-- renciación de Arizona y Salmonella la prueba del malonato.

Prueba de la Ureasa.

A partir de los tubos de TSI que resultaron positivos, inocular dos asadas, generosas en tubos que contengan caldo - - urea rápido (ver página 102)

incubar a 35°C, por 2 horas en baño maría. Descartar los cultivos que muestren reacción positiva, que se manifiesta después del periodo de incubación con una coloración púrpura - del medio debido a la transformación de urea a amoníaco por la reacción de la ureasa, alcalinizando el medio. Salmonella negativa (ver tabla No. II.)

Prueba de INViC

Para realizar la pruebas bioquímica que incluye esta - prueba el inóculo utilizado deberá provenir de los tubos positivos en TSI y negativos en la prueba de la ureasa.

Formación de Indol.

En los tubos de ensaye que contienen el medio se SIM - (ver página 98) se inocular por picadura y se incuba a 35°C por 24 horas. Agregar 5 gotas de reactivo de Kovac. Se dá como positivo si un color rojo intenso aparece dentro de 10 minutos y negativo cuando no aparece el color después de 10 minutos o es muy débil. Esta coloración se debe a la descomposición del triptófano, que al agregar una solución de para-dimetil-amino benzaldehido contenida en el reactivo de Kovac, extrae el indol y hace que sobresalga a la superficie del medio inoculado en forma de una capa delgada de color rojo intenso. Salmonella negativa (ver cuadro No. II).

En este mismo medio se puede ver la movilidad del germen que para Salmonella es positiva (ver cuadro No. II). Ponién dose de manifiesto por la turbidez difusa del medio de cultivo alrededor del canal de picadura.

Prueba de Voges - Proskauer

Se inoculan los tubos preparados con el medio (ver páginas 102 y 103) incubar a 35°C durante 48 horas. Se transfiere un ml a un tubo de ensaye, (el resto del cultivo se emplea para la prueba de rojo de metilo), se le agrega 0.6 ml de solución afa-naftol y 0.2 ml de solución de NaOH. Se agita enérgicamente y se deja expuesto al aire para que se oxide. Después de 4 horas un color rosa o carmesí hace positiva la prueba. La presencia del color rosa o carmesí indica la síntesis del acetilmetilcarbinol o acetoina en el desarrollo de un microorganismo durante 48 - - horas, en caldo glucososo. Cuando la textrosa es fermentada por ciertas bacterias, no solo forma ácidos y bases sino también - acetilmetilcarbinol en contacto con el aire. Se oxida a diaceti lo, que se combina con un componente de la peptona para formar el compuesto de color rosa carmesí. Dicha prueba es negativa pa ra Salmonella (ver cuadro No. II.)

Prueba del Rojo de Metilo.

A los 4 ml restantes del medio RM-VP utilizado para la prueba del Veges-Proskauer, solo que incubando a 96 horas a - - 35°C. Se agregan 3 gotas de solución de rojo de metilo. Dando - reacción positiva de un color rojo (acidez) y reacción negativa la aparición de color amarillo (alcalino). Esto se debe a que - algunas bacterias producen ácidos en alto grado por la hidrólisis de la glucosa y la acidez permanente constante, en tanto -- que otras son capaces de atacar los mismos ácidos que forman y convertirlos en álcalis; por esta razón para la prueba del rojo de metilo, es necesario una incubación mas prolongada. Esta - - reacción es positiva pra Salmonella (ver cuadro No. II).

Prueba del Citrato.

Se siembra una asada del cultivo en los tubos que contienen el caldo citrato de Koser (ver página 103).

Incubar por 4 días a 35°C. La presencia de un enturbiamiento - del medio por desarrollo bacteriano hace positiva la prueba. Esto indica que la bacteria es capaz de utilizar el citrato de un medio sintético como única fuente de carbono. Siendo generalmente esta prueba para Salmonella positiva, (ver cuadro No. II).

Prueba de Molonato.

Esta prueba se realiza para diferenciar si en las - - pruebas anteriores esta presente Salmonella o Arizona. Ya que ambas tienen las mismas reacciones en las pruebas bioquímicas anteriores (ver cuadro No. II). El inóculo se toma de los tubos de TSI que en la prueba de la Ureasa resultaron negativos.

Sembrar en los tubos que contienen el caldo malonato (ver página 103). Incubar a 35°C por 48 horas. Después de la incubación dar la prueba como positiva si el medio vira a color azul. Esto se debe a que la Arizona utiliza el malonato haciendo alcalino el medio, En tanto que Salmonella al no utilizar el malonato el medio permanece de color azul. Siendo para Salmonella negativa esta prueba (ver cuadro No. II),

5.- Confirmación serológica.

Si las bioquímicas son típicas de Salmonella, sembrar en tubos de agar nutritivo inclinado (ver página 96) de los tubos de TSI que resultaron positivos. Incubar a 35°C por 24 horas.

Preparar una suspensión densa del cultivo en agar nutritivo, agregando 0.5 ml de solución salina.

Colocar en la parte superior de una laminilla de portaobjetos una gota de antisuero polivalente "O" para Salmonella.

Colocar en la parte inferior de la lámina una gota de la suspensión del cultivo preparado y colocamos una gota de solución salina fisiológica, separada de la anterior unos centímetros: y suspender en esta una gota de la suspensión de cultivo preparado. Y homogeneizar perfectamente.

Esta gota de solución salina y cultivo se utiliza para observar si no hay autoaglutinación.

Mezclar la gota del antisuero y el cultivo, agitando la lámina de atrás hacia adelante durante algunos segundos.

Observar contra un fondo plano y utilizando buena iluminación, la presencia de aglutinación por la formación rápida de grumos.

Una aglutinación parcial o retardada, debe considerarse negativa.

Repetir la aglutinación en la misma forma con los diferentes antisueros individuales, incluso el Vi. Evitar la desecación excesiva y que se mezcle un antisuero con otro.

La prueba se dá como positiva por la aglutinación rápida con el antisuero de grupo homólogo a su antígeno; en caso de una aglutinación con mas de un suero, se considerará específico aquel que aglutine primero o con mayor intensidad.

Cuando se presente aglutinación con antisuero Vi y no haya aglutinación con antisuero somático, hacer una suspensión densa del cultivo en 0.5 ml de solución salina al 0.85 %, calentar en baño de agua a ebullición durante 10 minutos, enfriar y probar nuevamente con antisuero D y C₁.

Si no aglutina con ningún grupo puede tratarse de cepas no incluidos en los grupos A-1.

Si no se dispone de otros antisueros de grupo o para tipificación completa, enviar a un laboratorio o Centro de Referencia.

DISEÑO DE LA INVESTIGACION.

El presente trabajo es un tipo de investigación descriptiva de las técnicas y procedimientos que utiliza la Secretaría de Salud para mantener los productos lácteos dentro de una Norma de Control de Calidad Microbiológico.

Los criterios de inclusión són:

- Solo derivados lácteos elaborados y/o importados a México.

Los criterios de exclusión:

- No serán incluidos, aquellos productos no derivados de la leche (aún las imitaciones).

En la elaboración del trabajo será necesario instrumentar diferentes técnicas de investigación tales como:

a) Bibliografía:

- Manuales publicados por la Secretaria de Salud.
- Libros varios.

La recopilación de datos se realizará mediante fichas bibliográficas.

La presentación de técnicas y procedimientos se hará mediante esquemas y cuadros.

RECURSOS A UTILIZAR:

a) Equipo.

- Autoclave con termómetro o manómetro.
- Horno para esterilizar que alcance 180°C.
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 0.5°C.

- Baño María con termostato y termómetro.
- Baño María con agitador, termostato y termómetro.
- Contado de colonias Quebec o equivalente.
- Contador manual de Tally.
- Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato con vasos esterilizables (Pyrex o aluminio).
- Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g.

b) Material:

- Mechero Bunsen.
- Frasco de vidrio de boca angosta de 250 ml de capacidad con tapa de rosca.
- Frascos de vidrio de boca ancha tipo tarro de 250 ml de capacidad y tapa de rosca.
- Cajas de Petri de 100 X 15 mm.
- Pipetas bacteriológicas de 10 y 1 ml graduados en 0.1 y 0.01 ml respectivamente, protegidas con tapón de algodón.
- Tubos de cultivo de 16 x 150 mm.
- Tubos de cultivo de 13 x 100 mm.
- Tubos de cultivo de 10 x 75 mm.
- Tubos pequeños o campanas de fermentación.
- Portaobjetos.
- Varilla de vidrio de 3 mm de diámetro y 20 cm de largo con un doblez terminal en ángulo recto de 4 cm.
- Asa de micromel o platino.
- Gradilla adecuada a los tubos.

Todo el material y utensilios que se utilicen deberán estar estériles.

c) Medios de cultivo:

- Agar Triptona Extracto de Levadura.
- Agar Rojo Violeta Bilis.
- Agar Papa Dextrosa.
- Agar Azul de Toluidina DNA.
- Agar Salmonella, Shigella (ASS)
- Agar Sulfito de Bismuto.
- Agar Verde Brillante.
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)
- Agar Hierro Lisina (LIA).
- Agar Nutritivo.
- Medio de Baird Parkér.
- Medio de SIM.
- Caldo Lauril Sulfato de Sodio.
- Caldo EC.
- Caldo Infusión Cerebro Corazón.
- Caldo Tetracionato.
- Caldo Selenito Cistina.
- Caldo Urea rápido.
- Caldo MR - VP.
- Caldo Citrato.
- Caldo Malonato.
- Agua Peptonada.
- Agua Peptonada con fosfatos.

d) Soluciones y Colorantes.

- Solución de Acido Tartárico 10 %
- Solución amortiguadora 0.05 Tris (hidroximetil-amino metano)
- Solución de Cloruro de Calcio Anhidro 0.01 M
- Solución de Azul de Toluidina.
- Solución Amortiguadora de Fosfato.
- Solución Salina al 0.85 %.

- Solución Amortiguadora al 0.85 % E.D.T.A.
- Solución de Telurito al 1%.
- Solución Yodo-Yodurada.
- Solución de Alfa-naftol al 5%.
- Solución de Hidróxido de Sodio al 40 %.
- Reactivo de Kovac.
- Solución de Verde Brillante al 1 %.
- Solución de Roja de Metilo.

INTERPRETACION DE RESULTADOS.

En los productos lácteos sometidos a tratamiento térmico, un recuento elevado de bacterias mesofílicas aerobias; - revelan claramente una preservación inadecuada o una extensa - exposición a la contaminación como puede ser:

- Materias primas o ingredientes muy contaminados.
- Deficiente aseó o desinfección en el equipo.
- Deficiente refrigeración.
- Insuficiente tratamiento térmico.

La presencia de organismos coliformes, tanto fecales - como totales en los productos lácteos pasteurizados; revelan -- deficientes prácticas higiénicas.

En mantequilla indica contaminación postpasteurización o por el agua.

En helados delata la calidad de las materias primas -- utilizadas.

En los quesos madurados la posibilidad de desarrollo, se condiciona a la composición química del producto (acidez, -- humedad, salinidad) y con frecuencia secundaria a las condiciones higiénicas de fabricación.

La abundancia de hongos en los productos lácteos revela una amplia exposición del producto al medio ambiente. En tanto que la presencia de levaduras indica un deficiente lavado de - los utensilios y equipo que se utilizan en su elaboración. Así mismo puede reflejar la defectuosa conservación de los produc-- tos elaborados.

La interpretación del significado relativo del hallazgo de estafilococos en un determinado alimento debe hacerse -- con mucho cuidado.

En el caso de productos lácteos, no pasteurizados, pueden contener una abundante carga de estafilococos. El significado de estos gérmenes en tales alimentos, está principalmente en relación con su capacidad de producir enterotoxinas, si la temperatura de conservación es apropiada para ello.

En algunos alimentos la formación de toxina es mínima si la comparamos con la abundante presencia de estafilococos.

Por otra parte, en los productos lácteos elaborados - con leche pasteurizada, la presencia de *Staphylococcus aureus* son excelentes indicadores de los cuidados higiénicos en que - fueron manipulados por el personal que trabaja en la fábrica, ya que este microorganismo puede llegar a los productos por - infecciones respiratorias, que padezca o haya padecido recientemente el trabajador, o por medio de las manos que presenten alguna lesión séptica.

Como indicadores de la eficiencia de los procedimientos de desinfección de superficies en la fábrica de alimentos, ya que son bastante resistentes a la desecación.

La presencia de *Salmonella* en los productos que han - sido pasteurizados o tratados térmicamente, indica una contaminación cruzada posterior; que puede ser debido a la falta de - refrigeración, adición de ingredientes contaminados o deficiente lavado y desinfección del equipo.

CONCLUSIONES.

Después de haber realizado los análisis microbiológicos, con las técnicas autorizadas por la Secretaría de Salud, - descritas anteriormente. Durante los meses de mayo, junio y julio del presente año en productos lácteos, tanto de marcas registradas así como de marcas libres. Pudimos comprobar que los productos de marcas registradas han mejorado notablemente su control microbiológico en los últimos años; ya que la mayoría - se encuentra por abajo de las normas microbiológicas establecidas. En tanto que los productos de marcas libres se encuentran fuera de norma e incluso, encontramos en algunos de estos productos bacterias patógenas, como son la Salmonella y Estaphylococcus aureus. Representando estos productos un riesgo potencial a la salud.

Por lo que se hace necesario intensificar una campaña sobre la necesidad imprescindible de promover las normas de higiene para la elaboración de estos productos en la pequeña industria.

Por otra parte nosotros después de haber realizado los análisis con las técnicas oficiales llegamos a las siguientes conclusiones. Son técnicas sencillas y adaptables, de fácil interpretación, muy reproducibles y de alta confiabilidad.

Logrando con ello un excelente control de calidad que es lo que actualmente se está tratando de hacer para tener una mayor competitividad, ahora que se está abriendo el libre comercio en todos los mercados.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ANALISIS MICROBIOLOGICO DE LOS ALIMENTOS.
F.S. Thatcher y D.S. Clark
ACRIBIA
España, 1973.
- 2.- BACTERIOLOGIA.
A.J. Salle.
Segunda edición.
Gustavo Gili.
Barcelona, 1965.
- 3.- BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL FOR FOODS.
5th Ed.
Food and Drug Administration.
Washington, D. C. 1978.
- 4.- ECOLOGIA MICROBIANA DE LOS ALIMENTOS:
VOL. I FACTORES QUE AFECTAN A LA SUPERVIVENCIA
DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS ALIMENTOS.
International Commission on Microbiological
Specifications for Foods
ACRIBIA
España, 1983.
- 5.- ECOLOGIA MICROBIANA DE LOS ALIMENTOS:
VOL. II PRODUCTOS ALIMENTICIOS.
International Commission on Microbiological
Specifications for Foods.
ACRIBIA
España, 1984.
- 6.- HIGIENE Y TOXICOLOGIA DE LOS ALIMENTOS.
Betty C. Hobbs y Richard J. Gilbert.
Segunda edición.
ACRIBIA
España, 1986.

- 7.- LABORATORY METHODS IN FOOD AND DAIRY
MICROBIOLOGY.
Margaret Harrigan W.F.
Academic Press
London, 1976.
- 8.- LEYES Y CODIGOS DE MEXICO: LEY GENERAL DE SALUD.
Séptima Edición.
Porrúa
México, 1991.
- 9.- MANUAL DE TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA ANALISIS MICRO-
BIOLOGICO DE DERIVADOS LACTEOS.
Laboratorio Nacional de Salud Pública.
S.S.A.
México, 1989.
- 10.- MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS.
W.C. Frazier y D.C. Westhaff.
Tercera edición.
ACRIBIA.
España, 1985.
- 11.- MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS Y SUS PROCESOS DE ELABORACION.
John T. Nickerson y Anthony J. Sinskey.
ACRIBIA
España, 1978.
- 12.- MICROBIOLOGIA SANITARIA: VOL. I AGUAS Y ALIMENTOS.
Eduardo Fernández Escartín
Universidad de Guadalajara.
Guadalajara, Jalisco: México, 1981.
- 13.- TECNICAS PARA EL MUESTREO Y ANALISIS MICROBIOLOGICO DE
ALIMENTOS.
Laboratorio Nacional de Salud Pública.
S.S.A.
México, 1975.

MEDIOS DE CULTIVO.

Agar con Triptona y Extracto de Levadura.

Fórmula:

Extracto de Levadura.	2.5	g.
Peptona de Caseína.	5	g.
Glucosa.	1	g.
Agar	15	g.
Agua destilada.	1000	ml.
pH 7.0 ± 0.1		

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada dejar reposar. Mezclar perfectamente y ajustar el pH 7 ± 0.1. Esterilizar a 15 libras (121°C) durante 15 minutos.

Agar Rojo Violeta Bilis.

Fórmula:

Extracto de Levadura	3	g.
Peptona.	7	g.
Sales Biliares.	1.5	g.
Cloruro de sodio.	5	g.
Lactosa.	10	g.
Rojo Neutro.	0.03	g.
Cristal Violeta.	0.002	g.
Agar.	15	g.
Agua Destilada.	1000	ml.
pH 7.4		

Suspender los ingredientes o 4.5 g. del medio deshidratador, en un litro de agua destilada y dejar reposar durante 1 minuto. Mezclar perfectamente y ajustar el pH, calentar con agitación constante y hervir durante 2 minutos.

Agar Papa Dextrosa.

Fórmula:

Infusión de papa blanca	200	ml
Dextrosa.	20	g.
Agar.	15	g.
Agua destilada.	1000	ml
pH 5.6		

Pesar los gramos del medio deshidratado, en un litro - de agua destilada y dejar reposar. Calentar en baño maría hasta completa disolución total del medio. Esterilizar en autoclave - a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 45 - 48°C y acidificar el pH - 3.5 con solución estéril de ácido tartárico al 10% (aproximada- mente 1.4 ml de ácido por cada 100 ml de medio). Una vez que se ha agregado el ácido tartárico no se vuelva a calentar el medio.

Agar Azúl de Toluidina DNA.

Fórmula:

Acido desoxirribonucleico helicoidal.	0.3	g.
Agar.	10	g.
Cloruro de calcio anhidro (solución 0.01 M)	1	g.
Cloruro de Sodio.	10	g.
Azúl de toluidina (Solución 0.1 M)	3	g
Tris-(hidroximetil - aminometano). (Tris solución 0.05 M pH 9).	1000	ml.

Disolver los ingredientes, excepto el azúl de toluidina, calentando a ebullición. Agregar el azúl de toluidina. Distri- buir en frascos pequeños con tapón de hule. No es necesario es- terilizar.

Tomar un portaobjetos limpio y agregar 3 ml del medio fundido, esparciéndolo por la superficie. Cuando el agar solidifique hacer orificios de 2 mm. de diámetro con una pipeta - Pasteur.

Agar S. S.

Fórmula:

Extracto de carne	5	g.
* Polipeptona.	5	g.
Lactosa	10	g.
Sales biliares.	8.5	g.
Citrato de Sodio.	8.5	g.
Tiosulfato de sodio.	8.5	g.
Citrato férrico.	1	g.
Agar.	13.5	g.
Verde brillante, solución al 0.1 %	0.33	ml
Rosa neutro.	0.25	g
Agua destilada.	1000	ml

Suspender los ingredientes o 60 g. del medio deshidratado en un litro de agua destilada dejar, reposar ajustar el pH a 7 ± 0.2 . Calentar a ebullición hasta disolución completa. No esterilizar en autoclave.

Enfriar a 50°C , distribuir en cajas Petri estériles.

* La polipeptona se puede sustituir por 2.5 gr., de peptona de caseína y 2.5 grs., de peptona de carne.

Agar Verde Brillante.

Fórmula:

Extracto de levadura	3	g.
Proteosa peptona No.3 polipetona.	10	g.
Cloruro de sodio.	5	g.
Lactosa	10	g.
Sacarosa	10	g.
Rojo fenol.	0.08	g.
Verde brillante.	0.0125	g.
Agar	20	g.
Agua destilada.	1000	ml
pH 6.9 ± 0.1		

Disolver los ingredientes en el agua destilada, mezclar bien dejar reposar, ajustar el pH 6.9. Calentar a ebullición. - Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Enfriar a 50°C. Distribuir en cajas Petri estériles.

Agar Sulfito de Bismuto.

Fórmula:

Extracto de carne de res.	5	g.
Peptona	10	g.
Glucosa.	5	g.
Fosfato disódico (anhidro)	4	g.
Sulfato ferroso (anhidro)	0.3	g.
Sulfito de bismuto.	8	g.
Verde brillante.	0.025	g.
Agar	20	g.
Agua destilada.	1000	ml
pH 7.6 ± 0.2		

Suspender los ingredientes o 52 grs., del medio deshidratado en un litro de agua destilada, dejar reposar y ajustar el pH a 7.7. Calentar hasta ebullición completa agitando frecuentemente. Enfriar a 50°C y distribuir en cajas Petri estériles.

El medio no se debe esterilizar en autoclave; el sobrecalentamiento afecta su selectividad.

Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD).

Fórmula:

Xilosa.	3.75	g.
L - lisina	5	g.
Lactosa.	7.5	g.
Sacarosa.	7.5	g.
Cloruro de sodio.	5	g.
Extracto de levadura.	3	g.
Rojo de fenol.	0.08	g.
Agar.	15	g.
Tiosulfito de sodio.	6.8	g.
Desoxicolato de sodio.	2.5	g.
Citrato de hierro y amonio.	0.80	g.
Agua destilada.	1000	ml
pH 6.9 ± 0.2		

Pesar los gramos del medio deshidratado en agua destilada. Dejar reposar y ajustar el pH 7.4 calentar con agitaciones frecuentes hasta que hierva. Enfriar a 50°C y vaciar en cajas - Petri estériles. No se esterilice, el sobrecalentamiento produce una precipitación; su reacción puede ser satisfactoria, pero las colonias pueden ser muy pequeñas.

Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)

Fórmula:

Polipeptona	20	g.
Cloruro de sodio.	5	g.
Lactosa.	10	g.
Sacarosa.	10	g.
Glucosa	1	g.
Sulfato ferroso amónico.	0.2	g.
Tiosulfato de sodio.	0.2	g.
Rojo de fenol.	0.025	g.
Agar	13	g.
Agua destilada	1000	ml
pH 7.3 ± 0.1		

Pesar 65 grs., del medio deshidratado y disolver en un litro de agua destilada, mezclar bien dejar reposar y ajustar - el pH a 7.3 ± 0.1. Calentar a ebullición, agitando ocasionalmente hasta completa disolución, enfriar a 60°C.

Distribuir en volúmenes, de 4 ml en tubos de 13 x 100 - mm y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Inclinar los tubos de manera que el medio de cultivo en el fondo, alcance una altura de 3 cm. y una parte inclinada de 2 a 3 cm.

Agar Hierro Lisina (LIA)

Fórmula:

Peptona o gelisato	5	g.
Extracto de levadura.	3	g.
Glucosa.	1	g.
L-lisina.	10	g.
Citrato férrico amónico.	0.5	g.
Tiosulfato de sodio.	0.4	g.
Púrpura de bromocresol.	0.02	g.
Agar.	15	g.
Agua destilada.	1000	ml
pH 6.7 ± 0.1		

Pesar los gramos del medio deshidratado y disolver en un litro de agua destilada, mezclar bien dejar reposar y - ajustar el pH 6.7 ± 0.1 . Calentar hasta ebullición con agitaciones frecuentes hasta conseguir la disolución. Enfriar a $50 - 60^{\circ}\text{C}$; distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos pequeños de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 12 minutos. Dejar que los tubos se enfrien en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 3 cm y una parte inclinada a 2 cm.

Agar Nutritivo.

Fórmula:

Extracto de carne.	3	g.
Peptona.	5	g.
Agar.	15	g.
Agua destilada.	1000	ml
pH 6.8 ± 0.2		

Suspender los grs. del medio deshidratado en agua destilada; dejar reposar 5 - 10 minutos, ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 . Calentar a ebullición hasta su disolución; dejar enfriar a 50°C , y distribuir en tubos de 13 x 100 mm en cantidades de un tercio de su volumen

Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Inclinare los tubos antes de solidifiquen.

Medio de Baird Parker.

Fórmula:

Base:

Triptona.	10	g.
Extracto de carne.	10	g.
Extracto de levadura.	5	g.
Cloruro de litio.	1	g.

Glicina.	5	g.
Piruvato de sodio.	12	g.
Agar	10	g.
	20	g.
Agua destilada.	1000	ml.

Suspender 60 grs del medio deshidratado en un litro de agua destilada, dejar reposar y ajustar el pH a 6.8. Calentar agitando constantemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Enfriar el medio a 45°C y agregar 10 ml de solución -- estéril de telurito de potasio al 1% y 90 ml de emulsión de -- yema de huevo. Homogeneizar y distribuir en cajas Petri estériles. Secar la superficie de las placas manteniendo las cajas - con las tapas ligeramente abiertas a 37°C durante una hora. -- Emplear las placas dentro de las 24 horas posteriores a su preparación.

Preparación de la emulsión de yema de huevo.

Lavar con agua y jabón los huevos que sean necesarios - y limpiarlos con una solución de yodo al 2 %. Abrir los huevos en condiciones asépticas y vaciarlos en un separador de claras. Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 ml y completar a 90 ml con solución salina.

Transferir a un matraz con trozos o perlas de vidrio y agitar fuertemente para formar la emulsión. Filtrar a través - de gasa.

Todo el material utilizado debe ser estéril y se trabajará en campana de flujo laminar o en condiciones asépticas.

Medio de SIM

Fórmula:

Tripticasa	20	g.
Triptona.	6.1	g.
Sulfato ferroso - amónico	0.2	g.
Tiosulfato de sodio.	0.2	g.
Agar	3.5	g.
Agua destilada.	1000	ml
pH 7.3		

Suspender 30 grs., de medio deshidratado en un litro de agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente - hasta lograr una disolución completa. Distribuir el medio en vo lúmenes de 2 ml en tubos de 13 X 100 mm y esterilizar en atocla ve a 121°C durante 15 minutos. Dejar solidificar en posición -- vertical.

Caldo Lauril Sulfato de Sodio.

Fórmula:

Triptona, tripticasa o peptona de caseína	20	g.
Lactosa.	5	g.
Fosfato manopotásico.	2.75	g.
Cloruro de sodio.	2.75	g.
Lauril sulfato de sodio.	5.	g.
Agua destilada.	0.1	g.
pH 6.8 ± 0.2	1000	ml

Disolver los ingredientes o 35.6 grs del medio deshidratado, en un litro de agua. Ajustar el pH. Distribuir en tubos de 16 x 150 mm con campana de fermentación en volúmenes de 10 ml. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Caldo EC

Fórmula:

Triptosa o tripticasa.	20	g.
Lactosa.	5	g.
Sales biliares.	1.5	g.
Fosfato dipotásico.	4	g.
Fosfato monopotásico.	1.5	g.
Cloruro de sodio.	5	g.
Agua destilada.	1000	ml
pH 6.9 ± 0.1		

Disolver los ingredientes a 37.6 grs, del medio deshidratado, en un litro de agua. Ajustar el pH. Hervir y distribuir 10 ml de medio en tubos de 18 X 150 mm con campana de fermentación. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)

Fórmula:

Infusión de cerebro de ternera.	200 ml
Infusión de corazón de res.	250 ml
Proteosa peptosa.	10 g.
Cloruro de sodio.	5 g.
Fosfato disódico.	2.5 g.
Glucosa.	2 g.
Agua destilada.	1000 ml
pH 7.4 ± 0.2	

Disolver los ingredientes o 37 grs., de medio deshidrado y ajustar el pH. Hervir y distribuir en tubos de 12 X 75 mm, en volúmenes de 0.5 ml. Esterilizar durante 121°C por 15 - minutos.

Caldo Tetracionato.

Fórmula:

Base:

Proteosa peptona o triptona.	5 g.
Sales biliares.	1 g.
Carbonato de calcio.	10 g.
Tiosulfato de sodio.	30 g.
Agua destilada.	1000 ml

Disolver 46 grs, de medio deshidratado en un litro de - agua destilada y calentar a ebullición.

Distribuir en volúmenes de 10 o 125 ml en recipientes - estériles, según se requiere. Conservar entre 5 y 8°C.

Antes de usar el medio agregar 2 ml de solución de yodo yodurado y 1 ml de solución de verde brillante por cada 100 ml de caldo.

El medio una vez adicionado de yodo no deberá calentarse; úsese el mismo día de su preparación.

Caldo Selenito Cistina.

Fórmula:

Triptona o polipeptona.	5	g.
Lactosa.	4	g.
Fosfato disódico.	10	g.
Selenito ácido de sodio.	4	g.
L - Cistina.	0.01	g.
Agua destilada.	1000	ml
pH 7 ± 0.2		

Disolver los ingredientes o 23 gr del medio deshidratado en un litro de agua destilada; calentar a ebullición durante 10 minutos en baño de agua y distribuir en volúmenes de 10 a -- 125 ml en recipientes estériles, según se requiera. Esterilizar 10 minutos por arrastre de vapor. No esterilizar en autoclave; úsese el mismo día de su preparación.

Agua Peptonada con fosfatos (Preenriquecimiento de Salmonella)

Fórmula:

Peptona	10	g.
Cloruro de sodio.	5	g.
Fosfato disódico.	9	g.
Fosfato monopotásico.	1.5	g.
Agua destilada.	1000	ml.
pH 7.1 ± 0.1		

Disolver los ingredientes en el agua destilada y ajustar el pH. Envasar en frascos con 225 ml., esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Agua Peptonada.

(Preenriquecimiento de Salmonella)

Peptona	1	g.
Agua destilada.	1000	ml.

Disolver y ajustar el pH a 6.9 ± 0.1 distribuir en - - frascos con 225 ml., esterilizar a 121°C por 20 minutos.

Caldo Urea Rápido.

Fórmula:

Urea.	20	g.
Fosfato monopotásico.	0.091	g.
Fosfato disódico.	0.095	g.
Extracto de levadura.	0.1	g.
Rojo de fenol al 0.2 %.	5.	ml
Agua destilada.	1000	ml
pH 6.8		

Disolver los ingredientes en el agua y ajustar el pH - 6.8. Esterilizar por filtración y envasar septicamente en tubos de cultivo estériles de 13 X 100 mm 5 ml.

Caldo MR - VP

Fórmula:

Peptona	7	g.
Glucosa	5	g.
Fosfato dipotásico.	5	g.
Agua destilada.	1000	ml
pH 6.9		

Disolver los ingredientes en el agua. Distribuir en tubos de 13 X 100 ml de medio y esterilizar a 121°C durante 10 minutos.

Este medio se utiliza por la prueba del rojo de metilo y Voges Proskauer.

Caldo citrato de Koser

Fórmula:

Fosfato monopotásico.	1	g.
Sulfato de magnesio.	.2	g.
Fosfato de sodio y amonio.	1.5	g.
Citrato de sodio.	3	g.
Agua destilada.	1000	ml
pH 6.7 ± 0.2		

Disolver los ingredientes en el agua y distribuir 10 ml por tubo y esterilizar a 121°C, durante 15 minutos.

Caldo malonato.

Fórmula:

Extracto de levadura.	1	g.
Sulfato de amonio.	2	g.
Fosfato dipotásico.	0.60	g.
Fosfato monopotásico.	0.40	g.
Cloruro de sodio.	2	g.
Malonato.	3	g.
Azúl de bromotimol.	0.025	g.
Agua destilada.	1000	ml
pH 6.7		

Disolver los ingredientes en un litro de agua. Distribuir en tubos de 13 X 100 2 ml, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

PREPARACION DE REACTIVOS Y COLORANTES.

Soluciones de ácido tartárico al 10 %.

Fórmula:

Acido tartárico	10	g.
Agua destilada.	100	ml.

Disolver y esterilizar a 121°C. durante 15 minutos.

Solución amortiguadora de fosfato.

Fórmula:

Fosfato monopotásico	34	g.
Agua destilada.	1000	ml

Disolver el fosfato en 500 ml de agua destilada ajustar el pH a 7.2 con hidróxido de sodio 1 N; llevar a un litro con -- agua destilada. Esterilizar durante 20 minutos a 121°C. Conser-- var en refrigeración. Tomar 1.25 ml de la solución y llevar a un litro con agua destilada, esta es la solución de trabajo.

Distribuir porciones de 99, 90 o 9 ml según se requiera, esterilizar a 121°C durante 20 minutos.

Solución amortiguadora Tris (hidroximetil-amino metano).
0.05 M.

Tris pH 9.05 P.M. = 121.1

Disolver 6.055 gr de Tris en 100 ml de agua destilada.

Solución de cloruro de calcio anhidro 0.01 M.

CaCl₂ P.M = 110.99

Disolver 0.1199 grs., de CaCl₂ en 100 ml de agua destila
da.

Solución de azul de toluidina 0.1 M.

Azul de Toluidina	3.05	g.
Agua destilada.	100	ml.

Disolver los gramos de toluidina en 100 ml de agua destilada.

Solución yodo - yodurada.

Cristales de yodo	6	g.
Yoduro de potasio	6	g.
Agua destilada	20	ml.

Conservese en frasco ambar.

Solución de verde brillante 0.1 %.

Verde brillante	0.1	g.
Agua destilada estéril	100	ml

Solución salina al 0.85 %

Cloruro de sodio.	0.85	g.
Agua destilada.	100	ml

Disolver el cloruro de sodio en agua y esterilizar a - - 121°C durante 15 minutos.

Solución anticuagulante de E.D.T.A.

Sal dipotásica de E.D.T.A.	2	g.
Agua destilada.	50	ml
Alcohol etílico	50	ml

Disolver el E.D.T.A. en el agua, calentando ligeramente al chorro del agua caliente. Agregar el alcohol y aforar a - 100 ml.

Utilizar 0.1 ml de esta solución por cada ml de sangre.

El volúmen que se vá a utilizar de esta solución se -- evapora colocando el matraz en la estufa a 35°C.

Solución de telurito de potasio al 1 %.

Telurito de potasio.	1	g.
Agua destilada.	100	ml

Solución de Alfa naftol

Alfa naftol.	1	g.
Alcohol etílico 95 %	100	ml.

Solución de hidróxido de sodio al 40 %.

Hidróxido de sodio.	40	g.
Agua destilada.	100	ml.

Solución de rojo de metilo.

Rojo de metilo	0.1	g.
Alcohol etílico	300	ml
Agua destilada.	500	ml

Disolver el indicador en el alcohol y adicionar el agua.

Reactivo de Kovac

P- dimetilamina benzaldehido	5	g.
Alcohol amílico	75	ml
Acido clorhídrico concentrado	25	ml

Disolver el aldehido en el alcohol y adicionar lentamente el HCl.

Solución de alfa naftol al 5 %.

Alfa naftol	5	g.
Alcohol etílico de 95°	100	ml