

II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

COMISIÓN

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 14 de febrero de 1991

por la que se adoptan determinados métodos de análisis y de prueba de la leche cruda y de la leche tratada térmicamente

(91/180/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 85/397/CEE del Consejo, de 5 de agosto de 1985, relativa a los problemas sanitarios y de policía sanitaria en los intercambios intracomunitarios de leche tratada térmicamente ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye la Directiva 89/662/CEE ⁽²⁾, y, en particular, el apartado 2 de su artículo 10,

Considerando que, con arreglo al apartado 2 del artículo 10 de la Directiva 85/397/CEE, la Comisión adoptará los métodos de análisis y de prueba que han de utilizarse para controlar el cumplimiento de las normas sobre la leche cruda y la leche tratada térmicamente;

Considerando que, en lo que concierne a la leche cruda, es necesario adoptar métodos que permitan determinar el contenido en gérmenes y células, el punto de congelación y la presencia de antibióticos;

Considerando que, en lo que concierne a la leche pasteurizada, es necesario adoptar métodos que permitan determinar la ausencia de gérmenes patógenos, el número de coliformes, el contenido en gérmenes, la ausencia de fosfatasa, la presencia de peroxidasa, la ausencia de antibióticos y el punto de congelación;

Considerando que, en lo que concierne a la leche esterilizada y la leche «a ultratemperatura» (UHT), es necesario adoptar métodos que permitan determinar el contenido en gérmenes y la ausencia de antibióticos;

Considerando que, por motivos técnicos, conviene en una primera fase adoptar métodos de análisis y de prueba de referencia que garanticen el cumplimiento de determinadas normas; que, a la espera de los resultados de ese estudio, corresponde a las autoridades competentes velar por que se utilicen métodos de rutina que permitan comprobar el cumplimiento de las normas de la Directiva 85/397/CEE;

Considerando que la determinación de los métodos de análisis y de prueba de referencia incluye la determinación de los procedimientos de análisis y la fijación de criterios de fidelidad que garanticen la interpretación uniforme de los resultados;

Considerando que las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité veterinario permanente,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

Los procedimientos de análisis y de prueba de referencia para la leche cruda serán los siguientes:

- determinación del punto de congelación,
- enumeración de microorganismos: contenido en gérmenes a 30°C,
- enumeración de células somáticas y,
- detección de antibióticos y sulfamidas.

⁽¹⁾ DO n° L 226 de 24. 8. 1985, p. 13.

⁽²⁾ DO n° L 395 de 30. 12. 1989, p. 13.

Artículo 2

Los procedimientos de análisis y de prueba de referencia para la leche pasteurizada serán los siguientes:

- determinación del punto de congelación,
- determinación de la actividad fosfatásica,
- determinación de la actividad peroxidásica,
- enumeración de microorganismos: contenido en gérmenes a 30°C,
- enumeración de microorganismos: contenido en gérmenes a 21°C,
- enumeración de coliformes: recuento de colonias a 30°C,
- detección de antibióticos y sulfamidas, y
- detección de microorganismos patógenos.

Artículo 3

Los procedimientos de análisis y de prueba de referencia para la leche UHT y la leche esterilizada serán los siguientes:

- determinación del punto de congelación,
- enumeración de microorganismos: contenido en gérmenes a 30°C, y
- detección de antibióticos y sulfamidas.

Artículo 4

La aplicación de los procedimientos de análisis y de prueba de referencia, la fijación de los criterios de fidelidad que deberán tenerse en cuenta y la toma de muestras se efectuarán con arreglo a las normas contenidas en el Anexo I.

Artículo 5

En el Anexo II se describen los procedimientos de análisis y de prueba de referencia mencionados en los artículos 1, 2 y 3.

Artículo 6

La presente Decisión será revisada antes del 31 de diciembre de 1992 para adaptarla a la evolución de los conocimientos científicos y técnicos.

Artículo 7

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 14 de febrero de 1991.

Por la Comisión
Ray MAC SHARRY
Miembro de la Comisión

ANEXO I

ÍNDICE

	<i>Página</i>
I. Disposiciones generales	4
II. Tomas de muestras de leche cruda y leche tratada térmicamente	6

I. DISPOSICIONES GENERALES

1. Introducción

En el presente capítulo se describen las disposiciones generales relativas a los reactivos, material, expresión de los resultados, precisión e informes del análisis. Las autoridades competentes de los Estados miembros y los laboratorios de control encargados de la toma de muestras y los análisis de la leche deberán respetar las disposiciones generales.

2. Reactivos

2.1. Agua

2.1.1. Siempre que se haga referencia al uso de agua para realizar soluciones, diluciones o enjuagues, se utilizará, salvo disposición en contrario, agua destilada, desionizada o desmineralizada de una pureza al menos equivalente. Si se utiliza para fines microbiológicos, se hallará libre de sustancias que puedan afectar o influir en el crecimiento de microorganismos en las condiciones del ensayo.

2.1.2. Cuando se haga referencia a «solución» o «dilución» sin más indicaciones, se entenderá «solución en agua» o «dilución con agua».

2.2. Productos químicos

Todos los productos químicos que se utilicen tendrán, salvo disposición en contrario, una calidad pura para análisis.

3. Material

3.1. Listas de material

En las listas de material para los diversos procedimientos de referencia sólo figuran los elementos para un uso especializado y los elementos para una especificación determinada.

3.2. Balanza analítica

La balanza analítica es la que posee 0,1 mg de sensibilidad.

4. Expresión de los resultados

4.1. Resultados

Salvo indicación en contrario, el resultado que figure en el informe analítico será la media aritmética de dos pruebas que satisfagan el criterio de repetibilidad (5.1) establecido para el método en cuestión. Si no se satisface el criterio de repetibilidad, deberá repetirse la prueba siempre que sea posible, o anular el resultado.

4.2. Cálculo del porcentaje

El resultado se calculará como un porcentaje en masa de la muestra, salvo indicación en contrario.

5. Criterios de precisión: Repetibilidad y reproducibilidad

5.1. Los criterios de precisión para cada procedimiento se definen del modo siguiente:

5.1.1. «Repetibilidad (r)» es el valor por debajo del cual se sitúa la diferencia absoluta entre los resultados de dos análisis obtenidos con el mismo procedimiento, la misma muestra y bajo las mismas condiciones (el mismo analista, los mismos aparatos, el mismo laboratorio y en un breve intervalo de tiempo).

5.1.2. «Reproducibilidad (R)» es el valor por debajo del cual se sitúa la diferencia absoluta entre los resultados de dos análisis obtenidos con el mismo procedimiento, la misma muestra y bajo condiciones diferentes (analistas, aparatos, laboratorios y tiempos diferentes).

5.1.3. Salvo indicación en contrario, los valores de los criterios de repetibilidad y reproducibilidad que figuran en los apartados correspondientes de cada método representan márgenes de confianza del 95 %, según la definición ISO 5725 2ª edición de 1986. Se han calculado a partir de los resultados obtenidos en los ensayos multicentro utilizados para evaluar el procedimiento. No obstante, algunos procedimientos no han sido sometidos a ensayos multicentro. En estos casos, los valores de repetibilidad y reproducibilidad son aproximados.

5.1.4. Los ensayos multicentro y los estudios mencionados en el punto 5.1.3 se organizarán y realizarán de acuerdo con las directrices internacionales.

6. **Informe del análisis**

El informe del análisis deberá indicar el método utilizado y los resultados obtenidos. Además, deberá mencionar todos los detalles del procedimiento utilizado que no estén previstos en el método de análisis o que sean facultativos, así como toda circunstancia que haya podido influir sobre los resultados. El informe proporcionará toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra.

II. TOMA DE MUESTRAS DE LECHE CRUDA Y LECHE TRATADA TÉRMICAMENTE

1. Objeto y ámbito de aplicación

El presente capítulo describe el procedimiento de referencia de toma de muestras de la leche cruda y la leche tratada térmicamente.

Este procedimiento al igual que los de transporte y almacenamiento de muestras, se aplicarán a la leche cruda procedente de las entregas de los productores y a la leche cruda y tratada térmicamente que se halle almacenada y en cisternas de transporte.

Los procedimientos de los puntos 2, 4.4, 5 y 6 se aplicarán a la toma de muestras de leche para el consumo directo tratada térmicamente.

2. Generalidades

La toma de muestras de leche cruda y tratada térmicamente contenida en cántaras, cisternas, etc. será llevada a cabo por un operario cualificado que haya recibido una formación adecuada antes de proceder al muestreo de leche.

Si se considera conveniente, las autoridades competentes o el laboratorio de análisis instruirán al personal encargado en las técnicas de muestreo, a fin de garantizar que la muestra sea representativa y conforme a la totalidad de la partida.

Si se considera conveniente, las autoridades competentes o el laboratorio de análisis instruirán al personal responsable en el etiquetado de la muestra con vistas a garantizar la identificación inequívoca de la misma.

3. Material de muestreo

3.1. Generalidades

El material de muestreo será de acero inoxidable o de cualquier material apropiado, suficientemente sólido y adecuado al uso a que se destine (mezcla, muestreo, etc.). Los mezcladores y agitadores para la mezcla de líquidos en recipientes deberán tener una superficie suficiente para mezclar debidamente el producto, sin que aparezca un olor rancio. Los cacillos estarán provistos de un mango resistente de la longitud suficiente para poder obtener muestras en cualquier punto del recipiente. La capacidad del cacillo no podrá ser inferior a 50 ml.

Los recipientes de muestras, así como los dispositivos de cierre, serán de vidrio o de metales o plásticos adecuados.

El material de muestreo (incluidos los recipientes y dispositivos de cierre) estará hecho de materiales que no aporten a la muestra modificaciones susceptibles de afectar posteriormente a los resultados del análisis. Todas las superficies del material de muestreo y de los recipientes para muestras estarán limpias, secas, lisas y exentas de grietas; los ángulos estarán redondeados.

3.2. Material de muestreo para análisis microbiológico

El material de muestreo, incluidos los recipientes, cumplirá las disposiciones de punto 3.1 y, además, será estéril.

Si se utiliza el mismo material en muestreos sucesivos, éste se limpiará y esterilizará después de cada toma de muestras de conformidad con las instrucciones o requisitos establecidos por el laboratorio de análisis o la autoridad competente, de modo que se preserve la integridad de muestras posteriores.

4. Técnica de muestreo

4.1. Generalidades

Independientemente de los análisis que vayan a efectuarse, la leche se mezclará cuidadosamente antes del muestreo, ya sea de forma manual o mecánica.

La muestra se tomará inmediatamente después de la mezcla, mientras la leche esté aún en movimiento.

Cuando se tomen simultáneamente varias muestras de leche de cisternas para diferentes análisis, la destinada al análisis microbiológico se tomará en primer lugar.

El volumen de la muestra responderá a las exigencias del análisis. Los recipientes de muestras tendrán la capacidad suficiente para que la muestra los llene casi completamente y se produzca una buena mezcla del contenido antes del análisis, evitando el batido durante el transporte.

4.2. Muestreo manual**4.2.1. Muestreo de cubos y cántaras de leche**

Para lograr la agitación, introducir un mezclador en el cubo o cántara y efectuar movimientos rápidos ascendentes y descendentes, para garantizar que la leche esté convenientemente mezclada y la nata no esté adherida al cuello de la cántara. Se tomará una muestra representativa de toda la partida de conformidad con el apartado 4.2.4.

4.2.2. Muestreo de cisternas o tinas de leche de granja refrigerada

Agitar mecánica o manualmente la leche hasta obtener una homogeneidad suficiente.

Si el volumen de la leche es tal que el agitador mecánico no pueda mezclarla, la agitación se efectuará a mano.

4.2.3. Muestreo de un recipiente de medida

Es indispensable que la leche, al verterla en el recipiente de medida, se halle convenientemente mezclada. Si es necesario, se efectuará una agitación manual o mecánica para asegurar un reparto uniforme de la materia grasa. Cuando el volumen de la partida que deba someterse a muestreo sobrepase la capacidad del recipiente de medida, se tomará una muestra representativa de toda la partida de conformidad con lo establecido en el apartado 4.2.4.

4.2.4. Muestreo de leche repartida en varios lotes

Cuando la leche que deba someterse a muestreo se encuentre en más de un recipiente, se tomará una cantidad representativa de cada recipiente y se anotará la cantidad de leche a la que corresponda cada muestra. A menos que las muestras de cada recipiente deban someterse a análisis por separado, se mezclarán fracciones de estas cantidades representativas de forma proporcional a la cantidad contenida en el recipiente del que se haya tomado cada muestra. Se tomarán una o más muestras de estas cantidades proporcionales después de la mezcla.

4.2.5. Muestreo de grandes recipientes, Camiones cisterna, vagones cisterna y cisternas de almacenamiento**4.2.5.1. Antes del muestreo, mezclar la leche utilizando un método apropiado.**

Se recomienda el uso de la agitación mecánica para mezclar el contenido de grandes recipientes o de camiones cisterna, vagones cisterna y cisternas de almacenamiento (4.2.5.2).

El grado de mezcla estará en función del tiempo durante el que se haya dejado reposar la leche. Un método de mezcla, aplicado en una circunstancia determinada, se considerará eficaz si es el adecuado para los fines del análisis previsto; el criterio de eficacia de la mezcla influye, en particular, sobre la similitud de los resultados analíticos de muestras tomadas en lugares diferentes de las partidas o a la salida de la cisterna a diferentes intervalos durante el vaciado. Se considerará que un método de mezcla de leche es eficaz si la diferencia de los contenidos de materia grasa entre dos muestras tomadas en las condiciones descritas es inferior a 0,1 %.

Las pequeñas cantidades de leche obtenidas en el lugar de vaciado de grandes recipientes provistos de una salida situada en el fondo de los mismos, pueden no ser representativas del contenido, incluso después de la mezcla. Por lo tanto, es preferible tomar las muestras de la boca del recipiente. Si las muestras se toman de la salida para el vaciado, se dejará pasar antes la leche suficiente para garantizar que las muestras son representativas del contenido total.

4.2.5.2. La mezcla del contenido de grandes recipientes o de camiones cisterna, vagones cisterna y cisternas de almacenamiento podrá efectuarse:

- mediante un agitador mecánico con motor eléctrico incorporado a la cisterna,
- mediante un propulsor o agitador con motor eléctrico situado en la boca, con el agitador dentro del líquido,
- en el caso de camiones cisterna o vagones cisterna, haciendo circular la leche a través de la manga de transvase acoplada a las bombas de descarga de la cisterna y que se introducirá por la boca de ésta,
- mediante aire comprimido limpio que se habrá filtrado. En este caso, se utilizará una presión y un volumen de aire mínimos para evitar que aparezca el olor rancio.

4.3. Muestreo automático o semiautomático

Los dispositivos automáticos o semiautomáticos para el muestreo de leche cruda procedente de las entregas de los productores se utilizarán de conformidad con las instrucciones dadas por el laboratorio de análisis u otra autoridad competente.

Estos equipos, antes de ser utilizados por primera vez, y, posteriormente, a intervalos regulares, serán sometidos a las pruebas que señale la autoridad responsable. Será necesario comprobar que los procedimientos del muestreo son los más adecuados, a fin de poder determinar:

- el volumen mínimo de leche recogida que pueda ser sometido a muestreo de forma adecuada,
- el índice de efecto de arrastre que pueda producirse (que está relacionado con el volumen mínimo recogido),
- la capacidad de proporcionar una muestra representativa del producto después de una agitación adecuada.

Cuando se utilicen equipos de muestreo automático o semiautomático, las autoridades nacionales responsables podrán establecer:

- el volumen mínimo de leche del que deben extraerse muestras,
- el volumen mínimo de la muestra,
- el efecto de arrastre máximo,
- los análisis autorizados o las precauciones que deberán adoptarse.

4.4. *Muestreo de leche tratada térmicamente destinada al consumo directo en envases para la venta al por menor*

Las muestras de leche tratada térmicamente destinada al consumo directo en envases para la venta al por menor estarán constituidas por recipientes intactos y precintados. Es conveniente que las muestras se tomen de la máquina empacadora o del local frigorífico del establecimiento de tratamiento lo antes posible después de haberse efectuado la transformación, y, en el caso de la leche pasteurizada, el mismo día de la transformación.

De cada tipo de leche tratada térmicamente (pasteurizada, UHT y esterilizada) se extraerá el número de muestras necesarias para efectuar los análisis previstos y se observarán las instrucciones dadas por el laboratorio de análisis u otra autoridad competente.

5. **Identificación de la muestra**

La muestra irá provista de un código de identificación que permita distinguirla fácilmente, de acuerdo con las prescripciones del laboratorio de análisis o de la autoridad competente destinadas a garantizar la identidad de la muestra (punto 2).

6. **Transporte y almacenamiento de muestras**

El laboratorio de análisis, en función del tipo de leche y del método de análisis que se vaya a aplicar, elaborará las instrucciones sobre las condiciones de transporte, almacenamiento y período de tiempo entre la toma de muestras y el análisis de leche. Las instrucciones se establecerán de acuerdo con la autoridad nacional competente. Las instrucciones incluirán lo siguiente:

- Se adoptarán las precauciones necesarias para evitar la exposición a olores contaminantes y a la luz directa del sol durante el transporte y almacenamiento. Si los recipientes de muestras son transparentes, se almacenarán en un lugar oscuro.
- Las muestras de leche cruda para análisis microbiológico se transportarán y almacenarán a una temperatura comprendida entre 0°C y 4°C. El tiempo que medie entre la toma de muestras y el análisis será el menor posible, y en ningún caso podrá sobrepasar las 36 horas. La autoridad competente podrá permitir que la temperatura de almacenamiento esté comprendida entre 0°C y 6°C si el tiempo transcurrido entre la toma de muestras y el análisis no es superior a 24 horas.
- Las muestras de leche pasteurizada para análisis microbiológico se transportarán y almacenarán a una temperatura comprendida entre 0°C y 4°C. El tiempo transcurrido entre la toma de muestras y el análisis será el menor posible, y en ningún caso podrá sobrepasar las 24 horas.
- Las muestras de leche que no sea cruda ni pasteurizada para análisis microbiológico se mantendrán refrigeradas en el laboratorio y el tiempo que medie entre la toma de muestras y el análisis será el menor posible.

Las precauciones especiales que deben adoptarse en algunos análisis se especifican en los métodos correspondientes.

ANEXO II

ÍNDICE

	<i>Página</i>
I. Determinación del punto de congelación	10
II. Determinación de la actividad de fosfatasas	16
III. Determinación de la actividad de peroxidasas	19
IV. Enumeración de microorganismos — Recuento en placa a 30 °C	20
V. Enumeración de microorganismos — Recuento en placa a 21 °C	25
VI. Enumeración de coliformes — Recuento de colonias a 30 °C	29
VII. Enumeración de células somáticas	33
VIII. Detección de antibióticos y sulfamidas	39
IX. Detección de microorganismos patógenos	48

I. DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE CONGELACIÓN

1. Objeto y ámbito de aplicación

El presente capítulo especifica el procedimiento de referencia para la determinación del punto de congelación de la leche cruda, pasteurizada, UHT y esterilizada, entera, parcialmente desnatada y desnatada, mediante un aparato (el crioscopio de termistor) en el que el baño controlado termostáticamente se enfría mediante refrigeración eléctrica y el termómetro de mercurio es sustituido por una sonda de termistor.

Existen dos tipos de instrumentos. El primero de ellos detecta el punto máximo de congelación en la «meseta» de la curva de congelación, mientras que el segundo, por razones comerciales, está programado para realizar una lectura en un momento dado después de haber comenzado la congelación. Las diferencias que puedan producirse entre las curvas del punto de congelación de los diferentes tipos de leche, así como entre la curva de la leche y las de las soluciones patrón empleadas para el calibrado, hacen necesario utilizar instrumentos del primer tipo en este procedimiento de referencia.

Podrán utilizarse instrumentos de tiempo fijo para las mediciones rutinarias de detección.

El punto de congelación puede aplicarse al cálculo de la proporción de agua añadida a la leche, siempre que la acidez de la muestra no sea superior a 0,18 g de ácido láctico por 100 ml (véase punto 7.4).

2. Definición

Se entiende por «punto de congelación de la leche», expresado en grados Celsius (°C), el valor obtenido cuando se efectúa su medición de acuerdo con el procedimiento que se describe seguidamente.

3. Principio

Se somete una porción de muestra de leche a un superenfriamiento hasta alcanzar una temperatura adecuada según el instrumento utilizado y se provoca la cristalización mediante vibración mecánica, que ocasiona una rápida elevación de la temperatura hasta alcanzar una meseta que corresponde al punto de congelación de la muestra.

Se calibra el instrumento de modo que proporcione la lectura correcta de dos soluciones patrón, empleando el mismo procedimiento que se aplica a las muestras de leche. En estas condiciones, las mesetas proporcionan el punto de congelación de la leche en grados Celsius.

4. Aparatos y material de vidrio

Material ordinario de laboratorio y, en particular:

4.1. Crioscopio

El crioscopio consiste en un baño de refrigeración controlado termostáticamente, una sonda de termistor (termómetro de resistencia de semiconductores) con un circuito asociado y un galvanómetro o «lector», un agitador de la muestra, y un dispositivo para iniciar la congelación y tubos de muestras.

4.1.1. Baño de refrigeración

Pueden utilizarse baños de dos tipos:

4.1.1.1. De inmersión

Un baño que cuente con un buen aislamiento y un líquido de refrigeración adecuado, que se agitará de modo que la diferencia de temperatura entre dos puntos cualesquiera del líquido no sobrepase 0,2°C. La oscilación de la temperatura del líquido será como máximo de $\pm 0,5^\circ\text{C}$ sobre el valor nominal declarado por el fabricante.

El líquido del baño de refrigeración deberá mantenerse a un nivel constante. El líquido de refrigeración deberá cubrir toda la superficie del tubo de muestras que se halle por debajo de la marca de volumen.

4.1.1.2. De circulación

Se hará circular alrededor del tubo de muestras un flujo continuo de un líquido de refrigeración adecuado. La oscilación de la temperatura del líquido será como máximo de $\pm 0,5^\circ\text{C}$ sobre el valor nominal declarado por el fabricante.

Una solución acuosa de 1,2-etanodiol (etilenglicol) al 33% (v/v) se considera un líquido de refrigeración adecuado.

4.1.2. Termistor y circuito anexo

El termistor será del tipo de sonda de vidrio, con un diámetro que no sobrepase $1,80 \pm 0,2$ mm y con un diámetro de la guía de $0,31$ mm, como máximo. La constante de tiempo del termistor será inferior a 2 segundos y el valor de β será alto (véase la nota). La tensión de trabajo, la corriente y la constante de disipación no darán lugar a que la temperatura del termistor se eleve más de $0,0005^\circ\text{C}$ sobre la de su medio circundante a una temperatura de $-0,512^\circ\text{C}$. La tolerancia de la resistencia será de $\pm 5\%$.

Cuando la sonda se halle en posición operativa dentro del crioscopio, el extremo de la bola de vidrio deberá estar situado en el eje del tubo de muestras y a $44,6 \pm 0,1$ mm por debajo de la parte superior del tubo (véase la figura 1 en la página 15). Se empleará una plantilla para que el usuario pueda colocar la sonda en esta posición.

Nota:

El valor β define las características del termistor en cuanto a la resistencia y la temperatura, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \frac{\beta}{T^2},$$

siendo:

T = temperatura en la escala Kelvin

R = resistencia en ohmios a la temperatura T

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \text{coeficiente de temperatura}$$

β = constante que depende del material de que esté fabricado el termistor. En la práctica, se recomienda un valor superior a 3 000.

4.1.3. Dispositivo de medición y lectura

4.1.3.1. Principio de medición

El instrumento utilizado se regirá por el principio de búsqueda de la primera «meseta» de la curva del punto de congelación. La meseta es la parte de la curva donde la temperatura permanece constante con una oscilación de $\pm 0,002^\circ\text{C}$ durante 20 segundos como mínimo.

4.1.3.2. Funcionamiento manual

La resistencia del termistor se equilibrará mediante un puente de Wheatstone o un dispositivo similar, y se emplearán resistores estables de la mayor calidad, cuya tolerancia no sea superior al $\pm 10\%$ y cuyo coeficiente de temperatura no sobrepase $2 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$.

La linealidad del resistor variable (compensador) no variará en más de un $0,3\%$ de su valor máximo en toda la amplitud de su escala.

Deberá ser posible ajustar los resistores para efectuar el calibrado.

La escala de medición estará graduada a intervalos de $0,001^\circ\text{C}$ como máximo.

4.1.3.3. Funcionamiento automático

El dispositivo de lectura tendrá una discriminación de $0,001^\circ\text{C}$, como mínimo, entre 0 y -1°C .

La estabilidad del dispositivo de lectura y del circuito anexo permitirá que las indicaciones sucesivas de la misma temperatura no difieran en más de $0,001^\circ\text{C}$.

La linealidad del circuito garantizará que no se produzca ningún error mayor de $0,001^\circ\text{C}$ en ningún punto de la escala comprendida entre $-0,400^\circ\text{C}$ y $-0,600^\circ\text{C}$, si el instrumento se utiliza correctamente.

4.1.4. Agitador

Para remover la porción de muestra se utilizará un agitador de metal inerte a la leche de un diámetro comprendido entre 1 y 1,5 mm.

Se regulará la amplitud del agitador y se instalará en posición vertical; su parte inferior se hallará al mismo nivel que el extremo de la sonda del termistor, admitiéndose únicamente una tolerancia de 1,5 mm por encima o por debajo de esta posición.

La amplitud de la vibración del agitador declarada por el fabricante será suficiente ($\pm 1,5$ mm, como mínimo) para mantener la porción de muestra a una temperatura uniforme durante la determinación. El agitador, cuando esté en funcionamiento, no entrará jamás en contacto con la sonda de termistor o las paredes del tubo.

- 4.1.5. **Dispositivo para iniciar la congelación**
Podrá utilizarse para este fin cualquier dispositivo que, al entrar en funcionamiento, produzca instantáneamente la congelación de la muestra, de manera que la temperatura de la porción se acerque hacia el punto de congelación. Puede utilizarse para ello el agitador, incrementando la amplitud de la vibración durante 1 o 2 segundos, de modo que golpee la pared del tubo de muestras.
- 4.1.6. **Tubos de muestras**
Serán de vidrio, con una longitud de $50,8 \pm 0,1$ mm, un diámetro externo de $16,0 \pm 0,1$ mm y un diámetro interno de $13,5 \pm 0,1$ mm (véase la figura 1). Las diferencias de espesor de las paredes del tubo no serán superiores a 0,1 mm.
Llevarán una marca de volumen a 29,8 mm por debajo de su extremo (a 21 mm por encima de la base del tubo), correspondiente a una muestra de $2,5 \pm 0,1$ ml de volumen.
- 4.1.7. **Fuente de electricidad**
La tensión de alimentación se estabilizará, ya sea dentro del apartado o fuera de él, de modo que la fluctuación no difiera más de $\pm 1\%$ del valor nominal cuando la fluctuación de la red sea del $\pm 6\%$.
- 4.2. **Balanza analítica**
- 4.3. **Matraces aforados** de 1 000 ml de capacidad, de la clase A.
- 4.4. **Estufa de desecación**, bien ventilada y que pueda mantener una temperatura de $130 \pm 1^\circ\text{C}$, o bien,
Horno eléctrico, ventilado, que pueda mantener una temperatura de $300 \pm 25^\circ\text{C}$.
- 4.5. **Desecador**
5. **Reactivos**
- 5.1. **Agua destilada en un recipiente de vidrio de borosilicato**, que se haya llevado al punto de ebullición y enfriado posteriormente a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ en un matraz provisto de un tubo de absorción de dióxido de carbono.
- 5.2. **Cloruro sódico**, de calidad analítica, de grano fino, desecado durante 5 horas a una temperatura de $300 \pm 25^\circ\text{C}$ en un horno, o bien, desecado en una estufa a una temperatura de $130 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas como mínimo, y enfriado a temperatura ambiente en un desecador.
- 5.3. **Preparación de las soluciones patrón**
Pesar en un frasco de pesada una cantidad adecuada (véase el cuadro 1 más abajo) de cloruro sódico desecado (5.2). Disolver en agua destilada (5.1), transvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 1 000 ml de capacidad y diluir con el agua a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta el envase.
Almacenar durante dos meses como máximo en botellas de polietileno bien cerradas de hasta 250 ml de capacidad a una temperatura de 5°C aproximadamente.

Cuadro 1

Punto de congelación de soluciones de cloruro sódico a una temperatura de 20°C

g Na Cl/l	$^\circ\text{C}$
6,859	- 0,408
7,818	- 0,464
8,149	- 0,483
8,314	- 0,492
8,480	- 0,502
8,646	- 0,512
8,811	- 0,521
8,977	- 0,531
9,143	- 0,541
10,155	- 0,600

Antes de emplear la solución patrón, invertir y hacer girar suavemente la botella varias veces, con objeto de mezclar homogéneamente su contenido. Nunca deberá agitarse violentamente la solución patrón de modo que pueda incorporarse aire.

Las muestras de la solución se obtendrán del matraz vertiendo la solución en un vaso de precipitados seco y limpio; nunca deberán emplearse pipetas para este fin.

No se utilizarán las soluciones de botellas cuyo contenido sea inferior a un cuarto de su capacidad y las producidas más de 2 meses antes, a menos que lleven incorporado un fungicida (por ejemplo, 10 g/l de solución de tiomersal).

6. Calibrado del crioscopio de termistor

El crioscopio se preparará de modo que la temperatura del aire circundante no se desvíe en más de 1°C de la temperatura de calibración. El crioscopio se mantendrá al abrigo de la luz solar directa o de corrientes de aire, y a una temperatura ambiente que no sobrepase los 26-27°C.

Comprobar que el crioscopio está en buenas condiciones de uso, de conformidad con las instrucciones del fabricante, y que ha sido encendido al menos 12 horas antes del calibrado. Comprobar la posición de la sonda, la amplitud de vibración del agitador y la temperatura de los líquidos de refrigeración.

Seleccionar las 2 soluciones patrón (véase el cuadro 1 más arriba) que más se aproximen a los valores previstos del punto de congelación de las muestras de leche que vayan a analizarse. Es preferible que la diferencia entre los puntos de congelación de las 2 soluciones sea de $-0,100^{\circ}\text{C}$ como mínimo.

(Actualmente existen algunos crioscopios en que está previsto que el circuito anexo al termistor se equilibre al alcanzar un determinado valor del punto de congelación dentro de la escala de medición del instrumento. En este caso, se facilita el calibrado si se emplea una solución patrón con este punto de congelación, cuyo valor deberá ser indicado por el fabricante).

Transvasar con la pipeta $2,5 \pm 0,1$ ml de una solución patrón a un tubo de muestras limpio y seco y poner en funcionamiento el crioscopio.

Nota:

Los tubos de muestras empleados en el calibrado se lavarán y enjuagarán con agua desmineralizada al mismo tiempo que los tubos que se empleen en el análisis de las muestras de leche, y serán del mismo tipo de vidrio que éstos. Las temperaturas de las soluciones patrón serán similares a las de las muestras de leche.

Ajustar los controles de calibrado, siguiendo las instrucciones del fabricante, hasta que el crioscopio dé la temperatura del punto de congelación de la solución patrón. Efectuar de nuevo el procedimiento utilizando la otra solución patrón y repetirlo varias veces alternando ambas soluciones hasta que las lecturas sucesivas de cada solución, sin efectuar ningún ajuste de los controles de calibrado, den el valor correcto del punto de congelación de cada una de ellas. El crioscopio estará entonces en condiciones de uso e indicará directamente el punto de congelación de la muestra de leche, sin necesidad de efectuar ninguna corrección.

7. Preparación de la muestra de ensayo

7.1. Almacenar las muestras, si es necesario, a una temperatura comprendida entre 0 y 5°C.

7.2. Eliminar de la muestra los cuerpos extraños visibles o las grasas lácteas sólidas, recurriendo al filtrado en un recipiente limpio y seco, si fuese necesario; mezclar la muestra suavemente. Si se usa un filtro, éste será inerte a la leche y podrá usarse a temperatura de laboratorio.

7.3. La leche podrá analizarse cuando se halle a la temperatura de almacenamiento (entre 0 y 5°C) o se podrá permitir que alcance la temperatura ambiente del laboratorio inmediatamente antes de iniciar el análisis. No obstante, las soluciones patrón y las muestras de leche deberán estar a la misma temperatura cuando se utilicen.

7.4. Determinar la acidez valorable de la leche con la mayor proximidad posible al momento en que se lleva a cabo el estudio del punto de congelación. No se analizarán las muestras cuya acidez supere 0,18 g de ácido láctico por 100 ml de leche.

7.5. La leche UHT y la esterilizada se dejarán reposar durante 20 minutos como mínimo en un recipiente abierto antes de su análisis.

8. Procedimiento**8.1. Controles preliminares**

Comprobar que el nivel y la temperatura del líquido de refrigeración se ajustan a las instrucciones del fabricante y que, si procede, la sonda del termistor se halla en un tubo de muestras vacío dentro del recipiente. Encender el crioscopio y comprobar que el líquido de refrigeración circula o está siendo agitado convenientemente, según el caso. Cuando el crioscopio haya estado encendido durante 12 horas como mínimo, comprobar la temperatura del líquido de refrigeración, así como la posición y amplitud de vibración del agitador.

8.2. Control sistemático del calibrado

Antes de cada análisis, medir el punto de congelación de una solución patrón de cloruro sódico (por ejemplo, una solución cuyo punto de congelación sea $-0,512^{\circ}\text{C}$) hasta que la diferencia entre dos determinaciones consecutivas no sea superior a $0,001^{\circ}\text{C}$. Si la media de estos valores difiere en más de $0,002^{\circ}\text{C}$ del punto de congelación de la solución patrón, deberá calibrarse de nuevo el crioscopio según lo dispuesto en el punto 6.

Si el crioscopio se usa ininterrumpidamente, efectuar el control sistemático del calibrado cada hora como mínimo. Se tendrán en cuenta las instrucciones del fabricante.

8.3. Determinación del punto de congelación de la leche

Invertir y hacer girar suavemente varias veces el recipiente de la muestra de leche con objeto de mezclar su contenido. Nunca se agitará violentamente la muestra de modo que pueda incorporarse aire.

Transvasar con una pipeta $2,5 \pm 0,1$ ml de la leche a un tubo de muestras limpio y seco y eliminar el líquido sobrante con ayuda de una pipeta. Comprobar que la sonda y el agitador están limpios y secos y, en caso necesario, secar cuidadosamente de abajo hacia arriba con un paño suave, limpio y sin pelusa.

Introducir el tubo de muestras en el crioscopio calibrado siguiendo las instrucciones del fabricante. Enfriar la leche e iniciar la congelación a la temperatura señalada por el fabricante, con un margen de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

(En algunos instrumentos automáticos, esta temperatura puede verse en el lector digital; en los instrumentos manuales se alcanza la precisión requerida asegurándose de que la congelación comienza cuando la aguja del galvanómetro coincide con la marca adecuada).

Si, por cualquier motivo, la congelación comenzase antes o después de la franja de temperatura indicada, interrumpir el análisis y repetirlo utilizando otra porción de muestra de leche. Si la segunda muestra se congelase antes de la temperatura especificada, se calentará durante 5 minutos otra porción de muestra a 45°C , con objeto de que se funda la materia grasa cristalina.

Dejar enfriar a la temperatura de análisis y analizar inmediatamente. Después del inicio de la congelación, la temperatura de la leche se elevará rápidamente hasta alcanzar un valor que permanecerá prácticamente constante durante algún tiempo antes de descender de nuevo. El punto de congelación será la temperatura más alta alcanzada durante ese período y se registrará ese valor.

Nota:

El tiempo en que la temperatura permanece constante y el intervalo de tiempo entre el inicio de la congelación y el momento en que se alcanza la temperatura más alta variarán de una muestra a otra, y serán mucho menores para el agua y las soluciones patrón de cloruro sódico que para la leche. Únicamente se registrará la temperatura más alta.

Una vez terminadas las mediciones, sacar el tubo, enjuagarlo con agua y secar en sentido ascendente la sonda de termistor y el agitador, utilizando un paño suave, limpio y sin pelusa; a continuación, realizar una segunda determinación empleando otra porción de la muestra de leche.

Si la diferencia entre los puntos de congelación obtenidos es mayor que el valor de la repetibilidad ($0,004^{\circ}\text{C}$), efectuar una segunda determinación utilizando otra porción de muestra. Si las dos determinaciones no difieren en más de $0,004^{\circ}\text{C}$, los valores se registrarán y se emplearán para calcular el resultado final.

8.4. Enfriamiento de la sonda

Tras utilizar el instrumento, colocar un tubo de muestras vacío en el recipiente y bajar la cabeza de funcionamiento, con objeto de que la sonda se mantenga fría. (El diseño de algunos crioscopios hace imposible esta operación; en esos casos, es necesario asegurarse de que la sonda se haya refrigerado bastante antes de iniciar las mediciones, lo que se logra llevando a cabo varias determinaciones ficticias hasta obtener resultados apropiados).

9. Expresión de los resultados

9.1. Cálculo

Si se confirma el calibrado tras llevar a cabo el control sistemático, calcular la media de los valores de las dos determinaciones aceptables del punto de congelación que se hayan obtenido, redondeados al tercer decimal.

Si la suma de los dos valores aceptables da un número impar, se redondeará la media al valor par más próximo, como muestran los siguientes ejemplos:

Punto de congelación (°C)

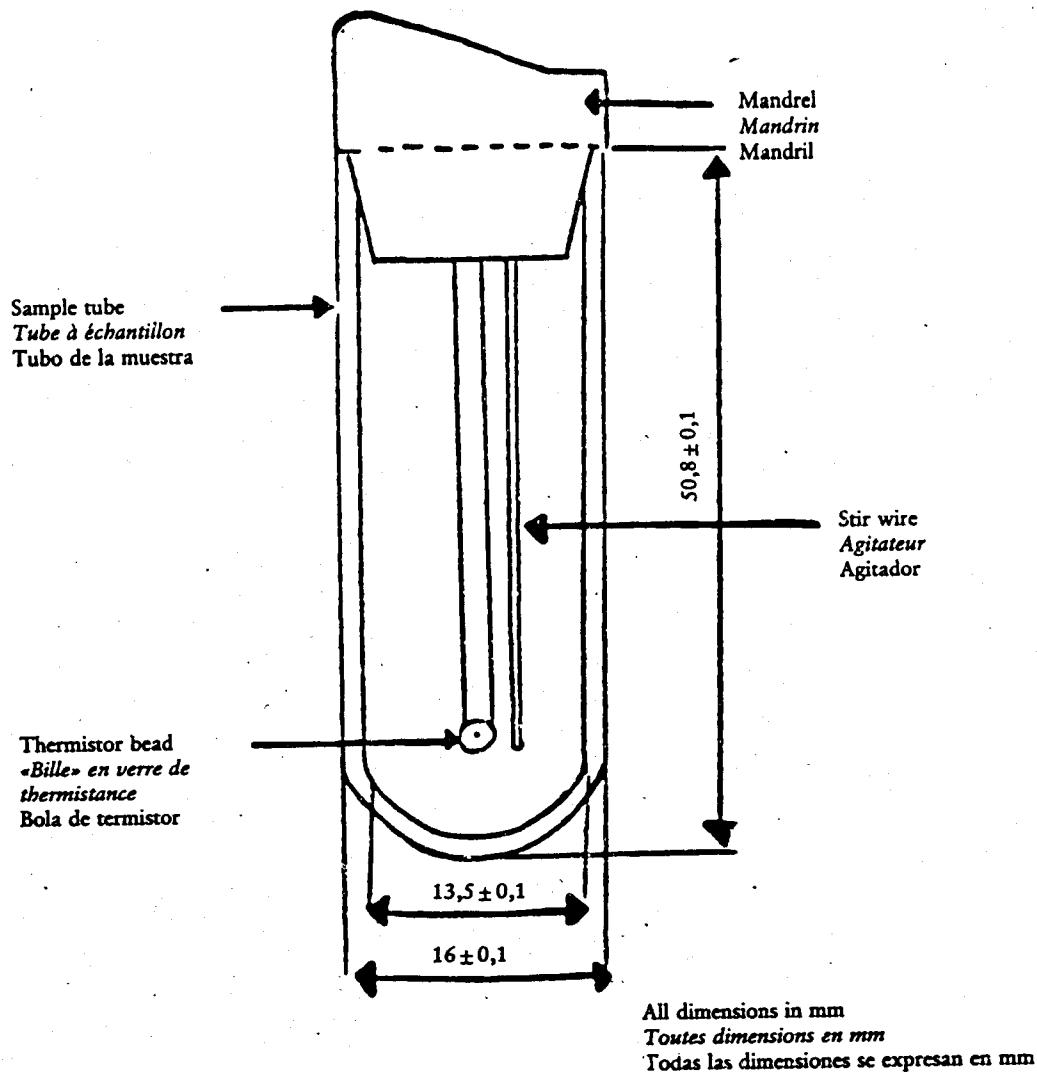
Valores obtenidos		Media
- 0,544	- 0,545	- 0,544
- 0,545	- 0,546	- 0,546

9.2. Precisión

9.2.1. Repetibilidad (r): 0,004 °C.

9.2.2. Reproducibilidad (R): 0,006 °C.

Detalle del crioscopio de termistor (4.1). (Posición del tubo de muestras en relación con la bola de termistor y el agitador)



II. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATÁSICA

1. Objeto y ámbito de aplicación

El presente capítulo especifica el procedimiento de referencia para la determinación de la actividad fosfatásica en la leche pasteurizada.

2. Definición

2.1. Se entiende por «actividad fosfatásica» la medición de la cantidad de fosfatasa alcalina activa presente en el producto, espesada como la cantidad, en microgramos, de fenol liberado por 1 ml de leche pasteurizada en las condiciones que se especifican en este método.

2.2. La leche cuya actividad fosfatásica sea inferior a 4 µg/ml se considerará fosfatasa negativa.

3. Principio

La actividad fosfatásica se evalúa en función de la cantidad de fenol liberado por el fenil-fosfato disódico que se añade a la muestra. El fenol liberado reacciona con la dibromoquinonaclorimida, produciendo dibromoindofenol (de color azulado) que se mide colorimétricamente a 610 nm. Se compara con una muestra en que se haya destruido la enzima fosfatasa.

4. Reactivos

4.1. *Tampón de hidróxido-borato de bario*

4.1.1. Disolver 50,0 g de hidróxido de bario $[Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O]$ en agua y completar hasta 1 000 ml.

4.1.2. Disolver 22,0 g de ácido bórico (H_3BO_3) en agua y completar hasta 1 000 ml.

4.1.3. Calentar 500 ml de cada solución a 50°C, mezclar las soluciones, remover, enfriar rápidamente hasta alcanzar 20°C, ajustar el pH, si es necesario, a $10,6 \pm 0,1$ añadiendo la solución 4.1.1 o 4.1.2. Filtrar. Conservar la solución en un envase perfectamente cerrado.

4.1.4. Antes del uso, diluir la solución en un volumen igual de agua.

4.2. *Tampón de desarrollo de color*

Disolver 6,0 g de metaborato sódico ($NaBO_2$) o 12,6 g de ($NaBO_2 \cdot 4H_2O$), y 20,0 g de cloruro sódico (NaCl) en agua y diluir a 1 000 ml.

4.3. *Tampón de dilución de color*

Diluir 10 ml de tampón de desarrollo de color (4.2) hasta 100 ml con agua.

4.4. *Sustrato tampón*

Disolver 0,1 g de fenilfosfato disódico deshidratado libre de fenol en 100 ml de tampón (4.1.3) o disolver 0,5 g de fenilfosfato disódico en 4,5 ml de tampón de desarrollo de color (4.2); añadir dos gotas de la solución BQC (4.6) y dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Extraer el color que se haya formado con 2,5 ml de alcohol butílico y dejar reposar hasta que el alcohol se separe. Retirar el alcohol butílico y desecharlo. Repetir la extracción si es necesario.

La solución podrá conservarse en un refrigerador algunos días; desarrollar el color y hacer una nueva extracción antes del uso. Preparar el sustrato tampón inmediatamente antes del uso, diluyendo 1 ml de esta solución a 100 ml con el tampón de hidróxido-borato de bario (4.1.3).

4.5. *Precipitante de zinc y cobre*

Disolver 3,0 g de sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) y 0,6 g de sulfato de cobre (II) ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) en agua y diluir a 100 ml.

4.6. *Solución de 2,6-dibromoquinonaclorimida (solución BQC)*

Disolver 40 ± 1 mg de 2,6-dibromoquinonaclorimida (BQC) ($C_6H_2Br_2ClNO_6$) en 10 ml de etanol al 96% (v/v).

Guardar en un frasco oscuro dentro de un refrigerador. Desechar si se decolora o si ha transcurrido más de un mes.

4.7. *Solución de sulfato de cobre (II)*

Disolver 0,05 g de sulfato de cobre (II) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en agua y diluir a 100 ml.

4.8. *Soluciones patrón de fenol*

4.8.1. Pesar 200 ± 2 mg de fenol anhidro puro, llevarlo a un matraz aforado de 100 ml, añadir agua, mezclar y enrasar. Esta solución madre permanece estable durante varios meses en refrigerador.

4.8.2. Diluir 10 ml de la solución madre con agua hasta 100 ml y mezclar. 1 ml contiene $200 \mu\text{g}$ de fenol.

5. *Aparatos y material de vidrio*

Notas:

- a) Se limpiarán cuidadosamente el material de vidrio, los tapones y los útiles de muestreo. Se recomienda enjuagarlos con agua destilada recién hervida o someterlos al vapor.
- b) No se autorizará el uso de determinados tipos de tapones de plásticos que pueden ocasionar contaminación fenólica.

Material ordinario de laboratorio y, en particular:

5.1. *Balanza analítica*

5.2. *Baño de agua* que pueda mantenerse a una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.3. *Espectrofotómetro* que pueda realizar lecturas a una longitud de onda de 610 nm.

5.4. *Tubos de ensayo*, de 16 o 18 mm \times 150 mm, graduados a 5 y 10 ml.

5.5. *Pipetas*

5.6. *Embudos de vidrio* de tamaño adecuado, por ejemplo, de 5 cm de diámetro.

5.7. *Filtros de pliegues* de 9 cm de diámetro como mínimo, de una velocidad de filtración media.

5.8. *Matraces aforados* para la preparación de las soluciones patrón.

6. *Procedimiento*

Notas:

- a) Durante la determinación, evitar la luz solar directa.
- b) La contaminación por restos de saliva o sudor puede dar resultados positivos falsos, y debe evitarse. A este respecto, se prestará una atención especial al pipeteado.

6.1. *Preparación de la muestra de ensayo*

6.1.1. Efectuar el análisis inmediatamente después del muestreo. Si no fuera posible, guardar la muestra en un refrigerador por espacio de 2 días como máximo.

6.2. *Porción de muestra*

Pipetear 1 ml de la muestra de ensayo en dos tubos de ensayo (5.4); uno de ellos se empleará como control o patrón.

6.3. *Determinación*

6.3.1. Calentar la muestra de ensayo en blanco durante 2 minutos en agua en ebullición, cubrir el tubo de ensayo y el recipiente de agua en ebullición con papel de aluminio, con objeto de que se caliente todo el tubo. Enfriar rápidamente a temperatura ambiente.

6.3.2. A partir de ese momento, tratar análogamente el blanco y la muestra de ensayo. Añadir 10 ml de sustrato tampón (4.4) y mezclar.

- 6.3.3. Inmediatamente después, incubar las muestras en el baño de agua (5.2) durante 60 minutos, mezclando el contenido esporádicamente (4 veces como mínimo).
- 6.3.4. Calentar en agua hirviendo durante 2 minutos, de la misma manera que se indica en el apartado 6.3.1. Enfriar rápidamente a temperatura ambiente.
- 6.3.5. Añadir a cada tubo 1 ml de precipitante de zinc y cobre (4.5) y mezclar cuidadosamente.
- 6.3.6. Filtrar con papel de filtro seco y desechar los primeros 2 ml; filtrar de nuevo, si es necesario, hasta que el filtrado sea totalmente claro y recoger 5 ml en un tubo de ensayo.
- 6.3.7. Añadir 5 ml de tampón de desarrollo de color (4.2).
- 6.3.8. Añadir 0,1 ml de la solución BQC (4.6), mezclar y dejar que se desarrolle el color durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 6.3.9. Medir la absorbencia con referencia al control o blanco en el espectrofotómetro (5.3) a una longitud de onda de 610 nm.
- 6.3.10. Si la absorbencia determinada de acuerdo con el apartado 6.3.9 sobrepasa la absorbencia del patrón de 20 µg de fenol por tubo, medida de acuerdo con el apartado 6.4.4, repetir la determinación con una dilución adecuada de la muestra.
- Preparar la dilución mezclando 1 volumen de la muestra de ensayo con un volumen adecuado de una parte de la misma muestra de ensayo, que se habrá calentado cuidadosamente hasta el punto de ebullición con objeto de inactivar la fosfatasa.
- 6.4. *Preparación de la curva de calibrado*
- 6.4.1. Preparar una serie de patrones diluidos, comenzando por el patrón fenol (4.8.2), que contengan 0 (control o blanco), 2, 5, 10 y 20 µg de fenol por mililitro, y pipetear, respectivamente, 1 ml de agua y 1 ml de cada una de las cuatro soluciones patrón de fenol en los cinco tubos de ensayo.
- 6.4.2. Añadir a cada tubo 1 ml de la solución de sulfato de cobre (II) (4.7), 5 ml de tampón de dilución de color (4.3), 3 ml de agua y 0,1 ml de solución BQC (4.6) y mezclar.
- 6.4.3. Dejar transcurrir 30 minutos para el desarrollo de color a temperatura ambiente.
- 6.4.4. Medir la absorbencia con respecto al control o blanco en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 610 nm.
- 6.4.5. Calcular la línea de regresión, a partir de los valores de absorbencia (6.4.4) obtenidos por cada cantidad de fenol que se haya añadido (6.4.1), mediante el método de mínimos cuadrados.
7. *Expresión de los resultados*
- 7.1. *Cálculo y fórmula*
- 7.1.1. Calcular la cantidad de fenol a partir del valor de la absorbencia (6.3.9) utilizando la línea de regresión que se haya obtenido (6.4.5).
- 7.1.2. Calcular la actividad fosfatásica, expresada en microgramos de fenol por mililitro de leche pasteurizada, mediante la siguiente fórmula:
Actividad fosfatásica = $2,4 \times A \times D$,
siendo:
A = cantidad de fenol en microgramos obtenida de conformidad con el apartado 7.1.1;
D = factor de dilución de la dilución contemplada en el apartado 6.3.10 (si no hay dilución, D = 1);
El factor de dilución es el factor 2,4 ($5/12$) de 1 ml de muestra problema (véase el apartado 6.2 en relación con los apartados 6.3.2, 6.3.5 y 6.3.6).
- 7.2. *Precisión*
- 7.2.1. Repetibilidad (r): 2 µg de fenol/ml.
- 7.2.2. Reproducibilidad (R): 3 (preliminar) µg de fenol/ml.
- 7.2.3. Si se aplica una dilución de conformidad con el apartado 6.3.10, el límite citado en los apartados 7.2.1 y 7.2.2 se referirá a los resultados obtenidos en la muestra diluida.

III. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDÁXICA

1. Objeto y ámbito de aplicación

El presente capítulo describe el procedimiento de referencia para la determinación de la presencia de la enzima peroxidasa en la leche como método de control de la pasteurización.

2. Definición

Reacción positiva a las peroxididasas

Si la pasteurización se ha realizado correctamente, aparecerá el color azul en los 30 segundos siguientes a la mezcla.

Reacción negativa a las peroxididasas

No aparecerá ningún color en los 30 segundos siguientes a la mezcla.

3. Principio

La enzima peroxidasa descompone el peróxido de hidrógeno. El oxígeno atómico liberado oxida la 1,4-fenilendiamina, incolora, que se convierte en indofenol púrpura (prueba de Storchs). La intensidad de color es proporcional a la concentración de la enzima.

4. Reactivos

4.1. Solución de 1,4-fenilendiamina

Disolver 2 g de 1,4-fenilendiamina ($C_6H_8N_2$) en agua caliente (50°C) y diluir a 100 ml. Conservar la solución en un frasco de color marrón oscuro con tapón de vidrio y almacenar en un lugar fresco y al abrigo de la luz. Uno o dos días después de la preparación, la solución de 1,4-fenilendiamina forma un sedimento, por lo que es necesario desecharla.

4.2. Solución de peróxido de hidrógeno

Diluir 9 ml de peróxido de hidrógeno al 30% en agua hasta 100 ml. Añadir 1 ml de ácido sulfúrico concentrado por litro de solución como estabilizador.

La solución de peróxido de hidrógeno permanece estable durante un mes si se conserva en un lugar fresco y al abrigo de la luz, en un frasco con tapón de vidrio que impida el contacto con compuestos orgánicos.

5. Procedimiento

5.1. Introducir 5 ml de la muestra de leche en un tubo de ensayo con cierre adecuado.

5.2. Añadir 5 ml de la solución de 1,4-fenilendiamina (4.1).

5.3. Añadir 2 gotas de solución de peróxido de hidrógeno (4.2).

5.4. Observar la aparición de color dentro de los 30 segundos siguientes a la mezcla. Si el color azul aparece más de 30 segundos después de la adición de los reactivos, la reacción no es específica.

IV. ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS, RECuento EN PLACA A 30°C

1. Objeto y ámbito de aplicación

El presente capítulo describe el procedimiento oficial para la enumeración de microorganismos mediante la técnica de recuento de colonias a 30°C.

El método es aplicable a la leche cruda y pasteurizada, así como a la leche UHT y esterilizada incubadas previamente durante 15 días a una temperatura de 30°C.

2. Definición

Se entiende por «microorganismos» aquellos organismos que forman colonias cuando se incuban aeróbicamente en las condiciones descritas.

3. Principio

Un volumen determinado de la muestra de leche se mezcla, en placas Petri, con el medio de cultivo, y se incuba a 30°C durante 72 horas. Se efectúa el recuento de colonias y el cálculo del número de microorganismos por mililitro de leche cruda o pasteurizada o por 0,1 ml de leche UHT o esterilizada, incubadas previamente.

4. Aparatos y material de vidrio

Material ordinario de laboratorio y, en particular:

4.1. Aparatos

- 4.1.1. Horno de aire caliente, que pueda funcionar a una temperatura comprendida entre 170 y 175°C.
- 4.1.2. Autoclave, que pueda funcionar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 4.1.3. Estufa, que pueda mantener una temperatura uniforme de $30 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 4.1.4. pH-metro, con compensación de temperatura y precisión de $\pm 0,1$ unidades de pH.
- 4.1.5. Baño de agua, que pueda funcionar a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 4.1.6. Lupa de 2 a 4 aumentos.
- 4.1.7. Lupa de 8 a 10 aumentos.
- 4.1.8. Contador registrador
- 4.1.9. Mezclador que permita mezclar 1 ml de la muestra de leche o una dilución decimal con 9 ml de diluyente y cuyo funcionamiento se base en el principio de la rotación excéntrica del contenido del tubo de ensayo.

4.2. Material de vidrio

- 4.2.1. Tubos de ensayo con cierres adecuados y de una capacidad suficiente para contener 10 ml de la dilución básica o de posteriores diluciones decimales, dejando espacio suficiente para mezclar.
- 4.2.2. Matraces de 150 a 250 ml de capacidad, o tubos de ensayo, de 20 ml de capacidad, aproximadamente, destinados a contener el medio de cultivo.
- 4.2.3. Pipetas (taponadas con algodón) de vidrio o de material sintético estéril, con la extremidad no desportillada, de 1 ml de capacidad nominal y con una abertura de 1,75 a 3 mm de diámetro.
- 4.2.4. Placas Petri, de vidrio no coloreado o de material sintético estéril; la placa inferior tendrá un diámetro interno entre 90 y 100 mm. La profundidad interior será de 10 mm como mínimo. El fondo no deberá presentar irregularidades que puedan interferir con el recuento de colonias.
- 4.2.5. Esterilización del material de vidrio:
El material de vidrio se esterilizará mediante uno de los siguientes métodos:
 - a) manteniéndolo durante 1 hora como mínimo en un horno de aire caliente (4.1.1) a una temperatura comprendida entre 170 y 175°C;
 - b) manteniéndolo durante 20 minutos como mínimo en un autoclave (4.1.2) a una temperatura de $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

Se comprobará que el vapor penetra adecuadamente en el autoclave; si se utilizan recipientes para la esterilización del material, no deberán cerrarse herméticamente, y los matraces irán provistos de tapas sueltas.

El material de vidrio esterilizado en el autoclave deberá secarse haciendo salir el vapor.

Las pipetas se esterilizarán en un horno de aire caliente (4.1.1).

5. Medio de cultivo — agar con leche para recuento en placa

5.1. Composición:

Extracto de levadura	2,5 g
Triptona	5,0 g
Glucosa D (+) o dextrosa	1,0 g
Leche desnatada en polvo	1,0 g
Agar	10 a 15 g, según las propiedades gelificantes del agar utilizado
Agua	1 000 ml

La leche desnatada en polvo estará libre de sustancias inhibitoras. Este particular se confirmará mediante pruebas comparativas utilizando una leche desnatada en polvo reconocida exenta de dichas sustancias.

Preparación:

Disolver y suspender en agua los componentes en el siguiente orden: extracto de levadura, triptona, glucosa y, por último, leche desnatada en polvo. El calentamiento del agua facilita esta operación. Añadir el agar y llevar a ebullición agitando continuamente hasta que el agar esté completamente disuelto o calentar al vapor durante 30 minutos aproximadamente.

Filtrar sobre papel de filtro, si es necesario.

Comprobar el pH con un pH-metro (4.1.4) y, si es necesario, ajustarlo utilizando una solución (de 0,1 mol/l como mínimo) de hidróxido sódico o de ácido clorhídrico, de modo que después de la esterilización, sea de $6,9 \pm 0,1$ a 25°C .

5.2. Distribución, esterilización y almacenamiento del medio de cultivo

Distribuir el medio (5.1) en matraces en cantidades de 100 a 150 ml o en tubos de ensayo de 12 a 15 ml (4.2.2). Cerrar los matraces y tubos.

Esterilizar durante 15 minutos en el autoclave (4.1.2) a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura.

Comprobar el pH del medio.

Si no se utiliza inmediatamente, conservar el medio al abrigo de la luz a una temperatura comprendida entre 1 y 5°C por un período máximo de 1 mes después de su preparación.

5.3. Medio de cultivo deshidratado adquirido en el mercado

El medio de cultivo (5.1) puede prepararse a partir de un medio deshidratado adquirido en el mercado. Seguir las instrucciones del fabricante y añadir leche desnatada en polvo antes de disolverlo en caso de que no sea uno de sus componentes.

Ajustar el pH a $6,9 \pm 0,1$ a 25°C , como se indica en el apartado 5.1; distribuir, esterilizar y almacenar el medio de conformidad con el apartado 5.2.

6. Diluyentes

6.1. Solución salina con peptona:

Composición:

Peptona	1,0 g
Cloruro sódico (NaCl)	8,5 g
Agua	1 000 ml

Preparación:

Disolver los componentes en agua y calentar si es necesario.

Comprobar el pH con un pH-metro (4.1.4) y, si es necesario, ajustarlo utilizando una solución (de 0,1 mol/l, como mínimo) de hidróxido sódico o ácido clorhídrico, de modo que después de la esterilización, sea de $7,0 \pm 0,1$ a 25°C .

- 6.2. *Distribución, esterilización y almacenamiento del diluyente*
- Repartir el diluyente (6.1) en tubos de ensayo (4.2.1) en cantidades tales que, tras la esterilización, los tubos contengan $9,0 \pm 0,2$ ml de diluyente. Tapar los tubos.
- Esterilizar durante 15 minutos en el autoclave (4.1.2) a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura.
- Comprobar el pH del diluyente.
- Si no se utiliza inmediatamente, almacenar al abrigo de la luz a una temperatura comprendida entre 1 y 5°C durante 1 mes, como máximo, después de la preparación.
- 6.3. *Diluyentes deshidratados adquiridos en el mercado*
- El diluyente (6.1) puede prepararse con pastillas o polvos deshidratados adquiridos en el mercado. Seguir las instrucciones del fabricante. Ajustar el pH de acuerdo con el apartado 6.1 y distribuir, esterilizar y almacenar los diluyentes como se indica en el apartado 6.2.
7. **Procedimiento**
- 7.1. *Fusión del medio*
- Antes de efectuar el examen microbiológico, fundir rápidamente la cantidad requerida del medio en un baño de agua [4.1.5.b)] o en una corriente de vapor en un recipiente parcialmente cerrado. Enfriar el medio a una temperatura de $45 \pm 1^\circ\text{C}$ en un baño de agua [4.1.5.a)].
- 7.2. *Preparación de la muestra de leche*
- Mezclar cuidadosamente la muestra invirtiendo rápidamente 25 veces el recipiente que la contenga, con el objeto de que los microorganismos se distribuyan con la mayor uniformidad posible. Evitar la formación de espuma, o dejar que se disperse. No deberán transcurrir más de 3 minutos entre la mezcla y la extracción de la porción de muestra.
- 7.3. *Preparación de la dilución primaria (10^{-1}) (leche cruda y pasteurizada)*
- Con la ayuda de una pipeta estéril (4.2.3), añadir 1 ml de la muestra (7.2) de leche cruda o pasteurizada a 9 ml de diluyente (6.1), evitando que éste entre en contacto con la pipeta. El diluyente y la muestra de leche estarán aproximadamente a la misma temperatura. Mezclar cuidadosamente la dilución primaria en el mezclador (4.1.9) de 5 a 10 segundos.
- De este modo, se obtiene una dilución primaria de 10^{-1} .
- 7.4. *Preparación de otras diluciones decimales (leche cruda y pasteurizada)*
- Con ayuda de una pipeta estéril (4.2.3), tomar 1 ml de la dilución primaria (7.3) y ponerlo en 9 ml de diluyente (6.1), siguiendo las instrucciones del apartado 7.3.
- De este modo se obtiene la dilución 10^{-2} .
- Preparar otras diluciones decimales de la misma manera hasta que se espere obtener el número de microorganismos adecuado (8.1.1).
- 7.5. *Siembra de las placas Petri*
- 7.5.1. **Leche cruda:** Transferir a una placa (4.2.4) 1 ml de la muestra y/o de la dilución decimal adecuada con ayuda de una pipeta estéril (4.2.3). Analizar como mínimo 2 diluciones. Preparar una placa de cada dilución escogida (8.1.1).
- 7.5.2. **Leche pasteurizada:** Transferir a una placa (4.2.4) 1 ml de la muestra y/o de la dilución decimal adecuada con ayuda de una pipeta estéril (4.2.3). Analizar 2 diluciones como mínimo. Preparar 2 placas de cada dilución escogida (8.1.1).
- 7.5.3. **Leche UHT y esterilizada** (analizar después de 15 días de incubación a 30°C de temperatura. Véase el punto 5 del capítulo VII del Anexo A de la Directiva 85/397/CEE):
- Transferir a una placa (4.2.4) 0,1 ml de la muestra de leche (7.2) con ayuda de una pipeta estéril (4.2.3). Preparar 2 placas.

7.6. *Vertido*

Verter en cada placa sembrada de 15 a 18 ml del medio (7.1), aproximadamente.

Mezclar inmediatamente por rotación de la placa Petri, con objeto de obtener colonias regularmente dispersadas después de la incubación.

El tiempo transcurrido entre la preparación de la muestra de leche y la mezcla con el medio no excederá de 15 minutos, en función del tipo de leche, la porción de muestra o la dilución.

Dejar reposar sobre una superficie horizontal limpia y fresca.

7.7. *Incubación de las placas Petri*

Poner las placas en la estufa (4.1.3). Incubarlas en posición invertida, apilando 6 como máximo. Las pilas de placas no deberán tocarse ni estar en contacto con las paredes o la parte superior de la estufa.

Incubar a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 ± 2 horas.

7.8. *Recuento de colonias*

Contar las colonias de las placas Petri que no contengan más de 300.

Examinar las placas bajo luz atenuada. Para facilitar el recuento se puede utilizar una lupa (4.1.6) y/o un contador-registrador (4.1.8). Evitar confundir las partículas de sustancias precipitadas en las placas con colonias puntiformes. Si es necesario, examinar cuidadosamente los elementos dudosos con ayuda de una lupa más potente (4.1.7), con objeto de distinguir las colonias de los elementos extraños.

Las colonias invasoras se consideran como colonias únicas. Si las colonias invasoras cubren menos de un cuarto de la placa, contar las de la parte de la placa no afectada y calcular el número correspondiente para la placa entera. Desechar la placa si las colonias invasoras cubren más de un cuarto de la misma.

8. *Cálculo y expresión de los resultados*8.1. *Leche cruda y pasteurizada*

8.1.1. Utilizar los recuentos de todas las placas que contengan entre 10 y 300 colonias (véanse los apartados 8.1.3 y 8.1.4).

8.1.2. Calcular el número de microorganismos por mililitro de leche cruda o pasteurizada mediante la fórmula siguiente:

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

siendo:

ΣC	= suma de todas las colonias obtenidas según el apartado 8.1.1,
$(n_1 + 0,1 n_2) d$	= volumen de la muestra utilizada, en la que:
n_1	= número de placas sometidas a recuento con la primera dilución,
n_2	= número de placas sometidas a recuento con la segunda dilución,
d	= factor de dilución del que se han obtenido los primeros recuentos.

Expresar los resultados con dos cifras significativas. Si la cifra que debe redondearse es 5, hacerlo de modo que la cifra situada a su izquierda sea par.

Ejemplo (para leche pasteurizada):

Dilución 10^{-2} : 278 y 290 colonias,

Dilución 10^{-3} : 33 y 28 colonias.

$$\begin{aligned} \text{Número/ml} &= \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-2}} \\ &= \frac{629}{0,022} \\ &= 28\ 590 \\ &= 29\ 000 \\ &= 2,9 \times 10^4. \end{aligned}$$

- 8.1.3. Si hay solamente recuentos inferiores a 10, indicar que el número de microorganismos por mililitro es «inferior a $10 \times d$ por ml»; siendo «d» la recíproca del factor de dilución más bajo.
- 8.1.4. Si hay solamente recuentos superiores a 300 pero es posible contarlos, calcular un recuento estimado y multiplicar por la recíproca del factor de dilución. Registrar este resultado como el «número estimado de microorganismos por mililitro».
- 8.2. *Leche UHT y esterilizada*
- 8.2.1. Se considerará que los recuentos en placa de más de 10 colonias por 0,1 ml ya no satisfacen los requisitos de la Directiva 85/397/CEE.
9. **Precisión**
- Aún no se dispone de resultados de ensayos multicentro aceptados internacionalmente.

V. ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS, RECuento EN PLACA A 21°C

1. Objeto y ámbito de aplicación

El presente capítulo describe el procedimiento de referencia para la enumeración de microorganismos mediante la técnica de recuento de colonias a 21°C en la leche pasteurizada después de incubar previamente la leche durante 5 días a 6°C, a fin de determinar el grado de contaminación de la leche pasteurizada por microorganismos psicotróficos, que se multiplican en la leche a 6°C.

2. Definición

Se entiende por «microorganismos» aquellos organismos que forman colonias cuando se incuban aeróbicamente en las condiciones descritas.

3. Principio

Incubar la leche pasteurizada durante 5 días a 6°C de temperatura. Mezclar un determinado volumen de la muestra de leche con el medio de cultivo en placas Petri e incubar durante 25 horas a 21°C. Efectuar el recuento de colonias y calcular el número de microorganismos en 1 ml de leche pasteurizada.

4. Aparatos y material de vidrio

Material ordinario de laboratorio y, en particular:

4.1. Aparatos

4.1.1. Horno de aire caliente, que pueda funcionar a una temperatura comprendida entre 170 y 175°C.

4.1.2. Autoclave, que pueda funcionar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.1.3. Estufa, que pueda mantener una temperatura uniforme de:

a) $6 \pm 0,2^\circ\text{C}$

b) $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.1.4. pH-metro con compensación de temperatura y precisión de $\pm 0,1$ unidades de pH.

4.1.5. Baño de agua, que pueda operar a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.1.6. Lupa de 2-4 aumentos.

4.1.7. Lupa de 8-10 aumentos.

4.1.8. Contador registrador.

4.1.9. Mezclador que permita mezclar 1 ml de la muestra de leche o de dilución decimal con 9 ml de diluyente y cuyo funcionamiento se base en el principio de la rotación excéntrica del contenido del tubo de ensayo.

4.2. Material de vidrio

4.2.1. Tubos de ensayo con cierres adecuados y de una capacidad suficiente para contener 10 ml de la dilución primaria o de posteriores diluciones decimales, dejando espacio suficiente para mezclar.

4.2.2. Matraces de 150 a 250 ml de capacidad, o tubos de ensayo de 20 ml de capacidad aproximadamente, destinados a contener el medio de cultivo.

4.2.3. Pipetas (taponadas con algodón) de vidrio o de material sintético estéril con la extremidad no desportillada, de 1 ml de capacidad nominal y con una abertura de 1,75 a 3 mm de diámetro.

4.2.4. Placas Petri, de vidrio no coloreado o de material sintético estéril; la placa inferior tendrá un diámetro interno de entre 90 y 100 mm. La profundidad interior será de 10 mm como mínimo. El fondo no deberá presentar irregularidades que puedan interferir con el recuento de colonias.

4.2.5. Esterilización del material de vidrio:

El material de vidrio se esterilizará mediante uno de los siguientes métodos:

a) manteniéndolo durante 1 hora como mínimo en un horno de aire caliente (4.1.1) a una temperatura comprendida entre 170 y 175°C;

b) manteniéndolo durante 20 minutos como mínimo en un autoclave (4.1.2) a una temperatura de $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

Se comprobará que el vapor penetra adecuadamente en el autoclave; si se utilizan recipientes para la esterilización del material, no deberán cerrarse herméticamente, y los matraces irán provistos de tapas sueltas.

El material de vidrio esterilizado en el autoclave deberá secarse haciendo salir el vapor.

Las pipetas se esterilizarán en un horno de aire caliente (4.1.1).

5. Medio de cultivo — agar con leche para recuento en placa

5.1. Composición:

Extracto de levadura	2,5 g
Triptona	5,0 g
Glucosa D (+) o dextrosa	1,0 g
Leche desnatada en polvo	1,0 g
Agar	10 a 15 g, según las propiedades gelificantes del agar utilizado
Agua	1 000 ml

La leche desnatada en polvo estará libre de sustancias inhibitoras. Este particular se confirmará mediante pruebas comparativas utilizando una leche desnatada en polvo reconocida exenta de sustancias inhibitoras.

Preparación:

Disolver y suspender en agua los componentes en el siguiente orden: extracto de levadura, triptona, glucosa y, por último, leche desnatada en polvo. El calentamiento del agua facilita esta operación. Añadir el agar y llevar a ebullición, agitando continuamente hasta que el agar esté completamente disuelto, o calentar al vapor durante 30 minutos aproximadamente.

Filtrar sobre papel de filtro, si es necesario.

Comprobar el pH con un pH-metro (4.1.4) y, si es necesario, ajustarlo utilizando una solución (de 0,1 mol/l como mínimo) de hidróxido sódico o de ácido clorhídrico, de modo que, después de la esterilización, sea de $6,9 \pm 0,1$ a 25°C.

5.2. Distribución, esterilización y almacenamiento del medio de cultivo

Distribuir el medio (5.1) en matraces en cantidades de 100 a 150 ml o en tubos de ensayo de 12 a 15 ml (4.2.2). Cerrar los matraces y tubos.

Esterilizar durante 15 minutos en el autoclave (4.1.2) a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura.

Comprobar el pH del medio.

Si no se utiliza inmediatamente, conservar el medio al abrigo de la luz a una temperatura comprendida entre 0 y 5°C por un período máximo de un mes después de su preparación.

5.3. Medio de cultivo deshidratado adquirido en el mercado

El medio de cultivo (5.1) puede prepararse a partir de un medio deshidratado adquirido en el mercado. Seguir las instrucciones del fabricante y añadir leche desnatada en polvo antes de disolverlo en caso de que no sea uno de sus componentes.

Ajustar el pH a $6,9 \pm 0,1$ a 25°C, como se indica en el apartado 5.1; distribuir, esterilizar y almacenar el medio de conformidad con el apartado 5.2.

6. Diluyentes

6.1. Solución salina con peptona:

Composición:

Peptona	1,0 g
Cloruro sódico (NaCl)	8,5 g
Agua	1 000 ml

Preparación:

Disolver los componentes en agua y calentar si es necesario.

Comprobar el pH con un pH-metro (4.1.4) y, si es necesario, ajustar el pH utilizando una solución (de 0,1 mol/l, como mínimo) de hidróxido sódico o ácido clorhídrico, de modo que, después de la esterilización, sea de $7,0 \pm 0,1$ a 25°C.

- 6.2. *Distribución, esterilización y almacenamiento del diluyente*
Repartir el diluyente (6.1) en los tubos de ensayo (4.2.1) en cantidades tales que, tras la esterilización, los tubos contengan $9,0 \pm 0,2$ ml del diluyente. Tapar los tubos.
Esterilizar durante 15 minutos en el autoclave (4.1.2) a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura.
Comprobar el pH del diluyente.
Si no se utiliza inmediatamente, almacenar al abrigo de la luz a una temperatura comprendida entre 1 y 5°C durante un mes, como máximo, después de la preparación.
- 6.3. *Diluyentes deshidratados disponibles en el mercado*
El diluyente (6.1) puede prepararse con pastillas o polvos deshidratados adquiridos en el mercado. Seguir las instrucciones del fabricante. Ajustar el pH de acuerdo con el apartado 6.1 y distribuir, esterilizar y almacenar los diluyentes como se indica en el apartado 6.2.
7. **Procedimiento**
- 7.1. *Fusión del medio*
Antes de efectuar el examen microbiológico, fundir rápidamente la cantidad requerida del medio. Enfriar el medio a una temperatura de $45 \pm 1^\circ\text{C}$ en un baño de agua (4.1.5).
- 7.2. *Preparación de la muestra de leche*
- 7.2.1. Incubar un envase cerrado de leche pasteurizada o, si no fuera posible, una muestra representativa de 100 ml, como mínimo, en una estufa [4.1.3.a)] a $6 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 120 ± 2 horas.
- 7.2.2. Después de la incubación, mezclar cuidadosamente la muestra invirtiendo rápidamente 25 veces el recipiente que la contenga, con objeto que los microorganismos se distribuyan con la mayor uniformidad posible. Evitar la formación de espuma o dejar que se disperse. No deberán transcurrir más de 3 minutos entre la mezcla y la extracción de la porción de muestra.
- 7.3. *Preparación de la dilución primaria (10^{-1})*
Con ayuda de una pipeta estéril (4.2.3), añadir 1 ml de la muestra (7.2.2) a 9 ml de diluyente (6.1), evitando que éste entre en contacto con la pipeta. El diluyente y la muestra de leche estarán aproximadamente a la misma temperatura. Mezclar cuidadosamente la dilución primaria en el mezclador (4.1.9) de 5 a 10 segundos.
De este modo, se obtiene una dilución primaria de 10^{-1} .
- 7.4. *Preparación de otras diluciones decimales*
Con ayuda de una pipeta estéril (4.2.3), tomar 1 ml de la dilución primaria (7.3) y ponerlo con 9 ml de diluyente (6.1), siguiendo las instrucciones del apartado 7.3.
De este modo se obtiene la dilución 10^{-2} .
Preparar otras diluciones decimales de la misma manera hasta que se crea poder obtener el número de microorganismos adecuado (8.1).
- 7.5. *Siembra de las placas Petri*
Transferir a una placa (4.2.4) 1 ml de la muestra y/o de la dilución decimal adecuada con ayuda de una pipeta estéril (4.2.3). Analizar como mínimo dos diluciones. Preparar 2 placas de cada dilución escogida (8.1).
- 7.6. *Vertido*
Verter en cada placa sembrada de 15 a 18 ml del medio (7.1), aproximadamente.
Mezclar inmediatamente por rotación de la placa Petri, con objeto de obtener colonias regularmente dispersadas después de la incubación.
El tiempo transcurrido entre el fin de la preparación de la muestra de leche y la mezcla con el medio no excederá de 15 minutos.
Dejar reposar sobre una superficie horizontal limpia y fresca.

7.7. *Incubación de las placas Petri*

Poner las placas en la estufa [4.1.3.b)]. Incubarlas en posición invertida, apilando 6 como máximo. Las pilas de placas no deberán tocarse ni estar en contacto con las paredes o la parte superior de la estufa.

Incubar a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 25 horas.

7.8. *Recuento de colonias*

Contar las colonias de las placas Petri que no contengan más de 300.

Examinar las placas bajo luz atenuada. Para facilitar el recuento se puede utilizar una lupa (4.1.6) y/o un contador-registrador (4.1.8). Evitar confundir las partículas de sustancias precipitadas en las placas con colonias puntiformes. Si es necesario, examinar cuidadosamente los elementos dudosos, con ayuda de una lupa más potente (4.1.7), con objeto de distinguir las colonias de los elementos extraños.

Las colonias invasoras se consideran como colonias únicas. Si las colonias invasoras cubren menos de un cuarto de la placa, contar las de la parte de la placa no afectada y calcular el número correspondiente para la placa entera. Desechar la placa si las colonias invasoras cubren más de un cuarto de la misma.

8. *Cálculo y expresión de los resultados*

8.1. Utilizar los recuentos de todas las placas que contengan entre 10 y 300 colonias (véanse los puntos 8.3 y 8.4).

8.2. Calcular el número de microorganismos por mililitro de leche cruda o pasteurizada mediante la fórmula siguiente:

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

siendo:

ΣC = suma de todas las colonias obtenidas según el apartado 8.1,
 $(n_1 + 0,1 n_2) d$ = volumen de la muestra utilizada, en la que:
 n_1 = número de placas sometidas a recuento con la primera dilución,
 n_2 = número de placas sometidas a recuento con la segunda dilución,
 d = factor de dilución del que se han obtenido los primeros recuentos.

Expresar los resultados con dos cifras significativas. Si la cifra que debe redondearse es 5, hacerlo de modo que la cifra situada a su izquierda sea par.

Ejemplo:

Dilución 10^{-2} : 278 y 290 colonias.

Dilución 10^{-3} : 33 y 28 colonias.

$$\begin{aligned} \text{Número/ml} &= \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-2}} \\ &= \frac{629}{0,022} \\ &= 28\,590 \\ &= 29\,000 \\ &= 2,9 \times 10^4. \end{aligned}$$

8.3. Si hay solamente recuentos inferiores a 10, indicar que el número de microorganismos por mililitro es «inferior a $10 \times d$ por ml»; siendo «d» la recíproca del factor de dilución más bajo.

8.4. Si hay solamente recuentos superiores a 300 pero es posible contarlos, calcular un recuento estimado y multiplicar por la recíproca del factor de dilución. Registrar este resultado como el «número estimado de microorganismos por mililitro».

9. *Precisión*

Aún no se dispone de resultados de ensayos multicentro aceptados internacionalmente.

VI. ENUMERACIÓN DE COLIFORMES, RECUENTO DE COLONIAS A 30°C

1. Objeto y ámbito de aplicación

El presente capítulo describe el procedimiento de referencia para la enumeración de coliformes en leche pasteurizada mediante la técnica de recuento de colonias a 30°C.

2. Definición

Se entiende por «coliformes» las bacterias que forman colonias características o colonias no características cuando se incuban a 30°C que fermentan la lactosa con liberación de gas en las condiciones descritas.

3. Principio

Un volumen determinado de la muestra de leche se mezcla, en placas Petri, con el medio de cultivo, y se incuba a 30°C durante 24 horas. Se efectúa el recuento de colonias características y, si es necesario, se confirma la identidad de las colonias no características comprobando su capacidad de fermentar la lactosa. Se calcula el número de coliformes por mililitro de leche pasteurizada.

4. Aparatos y material de vidrio

Material ordinario de laboratorio y, en particular:

4.1. Aparatos

- 4.1.1. Horno de aire caliente, que pueda funcionar a una temperatura comprendida entre 170 y 175°C.
- 4.1.2. Autoclave, que pueda funcionar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 4.1.3. Estufa, que pueda mantener una temperatura uniforme de $30 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 4.1.4. pH-metro, con compensación de temperatura y precisión de $\pm 0,1$ unidades de pH.
- 4.1.5. Baño de agua, que pueda funcionar a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 4.1.6. Aguja metálica de platino — iridio o de níquel — cromo.

4.2. Material de vidrio

- 4.2.1. Tubos de ensayo con cierres adecuados y de 20 ml de capacidad para contener el medio de confirmación (5.2) y tubos de Durham de dimensiones adecuadas para utilizarlos con los tubos de ensayo.
- 4.2.2. Matraces de 150 a 250 ml de capacidad, destinados a contener el medio sólido selectivo (5.1).
- 4.2.3. Pipetas (taponadas con algodón) de vidrio o de material sintético estéril, con la extremidad no desportillada, de 1 a 10 ml de capacidad nominal y con una abertura de 1,75 a 3 mm de diámetro.
- 4.2.4. Placas Petri, de vidrio claro no coloreado o de material sintético estéril; la placa inferior tendrá un diámetro interno de 90 a 100 mm aproximadamente. La profundidad interior será de 10 mm como mínimo. El fondo no deberá presentar irregularidades que puedan interferir con el recuento de colonias.
- 4.2.5. Esterilización del material de vidrio:
El material de vidrio se esterilizará mediante uno de los siguientes métodos:
 - a) manteniéndolo durante 1 hora como mínimo en un horno de aire caliente (4.1.1) a una temperatura comprendida entre 170 y 175°C;
 - b) manteniéndolo durante 20 minutos como mínimo en un autoclave (4.1.2) a una temperatura de $121 \pm 1^\circ\text{C}$.Se comprobará que el vapor penetra adecuadamente en el autoclave; si se utilizan recipientes para la esterilización del material, no deberán cerrarse herméticamente, y los matraces y frascos irán provistos de tapas sueltas.
El material de vidrio esterilizado en el autoclave deberá secarse haciendo salir el vapor.
Las pipetas se esterilizarán en un horno de aire caliente (4.1.1).

5. Medios de cultivo

5.1. *Agar lactosado con bilis, rojo y violeta (VRBL). Medio sólido selectivo.*

Composición:

Peptona	7 g
Extracto de levadura	3 g
Lactosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O)	10 g
Cloruro sódico (NaCl)	5,0 g
Sales biliares	1,5 g
Rojo neutro	0,03 g
Violeta cristal	0,002 g
Agar	10 a 15 g, según las propiedades gelificantes del agar utilizado
Agua	1 000 ml

Preparación:

Disolver y suspender en agua los componentes y dejar reposar unos minutos. A continuación, mezclar enérgicamente.

Comprobar el pH con un pH-metro (4.1.4) y, si es necesario, ajustar el pH utilizando una solución (de 0,1 mol/l como mínimo) de hidróxido sódico o de ácido clorhídrico, de modo que después de la ebullición, sea de $7,4 \pm 0,1$ a 25°C.

Llevar rápidamente a ebullición removiendo esporádicamente y distribuir inmediatamente en matraces estériles (4.2.2) cantidades de entre 100 y 150 ml.

Templar el medio en un baño de agua (4.1.5) a una temperatura de $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

Comprobar la esterilidad del medio cuando vaya a utilizarse (véase el apartado 6.4).

Utilizar el medio dentro de las 3 horas siguientes a su preparación.

5.2. *Caldo lactosado con bilis y verde brillante. Medio de confirmación.*

Composición:

Peptona	10 g
Lactosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O)	10 g
Bilis de vacuno deshidratada	20 g
Verde brillante	0,0133 g
Agua	1 000 ml

Preparación:

Disolver los componentes en agua llevándola a ebullición.

Comprobar el pH con un pH-metro (4.1.4) y, si es necesario, ajustar el pH utilizando una solución (de 0,1 mol/l, como mínimo) de hidróxido sódico o ácido clorhídrico, de modo que después de la esterilización, sea de $7,2 \pm 0,1$ a 25°C.

Repartir 10 ml del medio en cada uno de los tubos de ensayo (4.2.1) provistos de tubos de Durham. Cerrar los tubos.

Esterilizar en el autoclave (4.1.2) durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura.

Después de la esterilización, los tubos de Durham no contendrán burbujas de aire.

Comprobar el pH del medio.

Si no se utiliza inmediatamente, almacenar al abrigo de la luz a una temperatura comprendida entre 0 y 5°C durante 1 mes, como máximo, después de la preparación.

5.3. *Medios de cultivo deshidratados adquiridos en el mercado*

Los medios de cultivo (5.1, 5.2) pueden prepararse con medios deshidratados adquiridos en el mercado. Seguir las instrucciones del fabricante. Ajustar el pH y distribuir, hervir o esterilizar y almacenar los medios como se indica en los apartados 5.1 y 5.2.

6. Procedimiento

6.1. *Medio*

Utilizar el medio (agar VRBL) descrito en el apartado 5.1.

- 6.2. *Preparación de la muestra de leche*
 Mezclar cuidadosamente la muestra invirtiendo rápidamente 25 veces el recipiente que la contenga, con el objeto de que los microorganismos se distribuyan con la mayor uniformidad posible. Evitar la formación de espuma, o dejar que se disperse. No deberán transcurrir más de 3 minutos entre la mezcla y la extracción de la porción de muestra.
- 6.3. *Siembra de las placas Petri*
 Sembrar 3 ml de la muestra de leche (6.2) transfiriendo 1 ml de la muestra de leche a cada una de las tres placas (4.2.4) mediante una pipeta estéril (4.2.3).
- 6.4. *Vertido*
 Verter en cada placa sembrada 12 ml aproximadamente de agar VRBL (6.1).
 Mezclar inmediatamente por rotación de la placa Petri, con objeto de obtener colonias regularmente dispersadas después de la incubación.
 El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la muestra de leche y la mezcla de la porción de muestra con el medio no excederá de 15 minutos.
 Preparar una placa no sembrada para control de esterilidad añadiendo 12 ml del agar VRBL que se haya utilizado para las placas sembradas.
 Dejar reposar sobre una superficie horizontal, limpia y fresca, hasta que se solidifique el medio.
 Cuando se halle totalmente solidificado, verter como mínimo 4 ml de agar VRBL (6.1) sobre la superficie del medio sembrado.
 Dejar solidificar.
- 6.5. *Incubación de las placas Petri*
 Poner las placas en la estufa (4.1.3). Incubarlas en posición invertida, apilando 6 como máximo. Las pilas de placas no deberán tocarse ni estar en contacto con las paredes o la parte superior de la estufa.
 Incubar a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.
- 6.6. *Recuentos de colonias*
- 6.6.1. Contar las colonias de las placas Petri que no contengan más de 150. Realizar el recuento de las colonias de coloración roja oscura cuyo diámetro sea de 0,5 mm como mínimo, con o sin precipitado alrededor, característica de los coliformes.
- 6.6.2. Si todas las colonias, o una parte de ellas, presentan un aspecto no característico (por ejemplo, difieren de las colonias normales en lo que se refiere al color, tamaño o formación del precipitado) efectuar un análisis de confirmación (6.7).
- 6.7. *Análisis de confirmación*
 De acuerdo con las indicaciones del apartado 6.6.2, llevar a cabo un análisis de confirmación de un número apropiado (por ejemplo 3-5) de colonias no características efectuando una siembra en tubos que contengan caldo lactosado con bilis y verde brillante (5.2) con ayuda de una aguja metálica (4.1.6). Incubar los tubos a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.
 Considerar coliformes confirmados aquellas colonias que produzcan gas en el tubo de Durham.
7. *Cálculo y expresión de los resultados*
- 7.1. Utilizar los recuentos (véase el apartado 7.4) de las placas que no contengan más de 150 colonias.
- 7.2. Si se efectúa un análisis de confirmación, calcular el número de colonias de coliformes a partir del porcentaje de colonias de coliformes confirmadas.
- 7.3. Calcular el número de coliformes por mililitro de leche pasteurizada mediante la fórmula:
- $$\frac{\sum C}{n}$$
- siendo:

ΣC = suma de todas las colonias de coliformes (7.1) en relación con (7.2) apreciadas mediante el análisis de la muestra de leche (3 ml).

n = número de mililitros de la muestra analizada (6.3.1) (3 ml).

Expresar los resultados con 2 cifras significativas, si hay más de 100 colonias. Cuando la cifra que deba redondearse sea 5, hacerlo de modo que la cifra a su izquierda sea par.

Si solamente hay recuentos superiores a 150 colonias, registrar el resultado como el «número estimado de coliformes por mililitro».

8.

Precisión

Aún no se dispone de resultados de ensayos multicentro aceptados internacionalmente.

VII. ENUMERACIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS

El presente capítulo describe dos procedimientos de referencia para la enumeración de células somáticas:

- A. Método microscópico
- B. Método fluoroptoelectrónico

A. Método microscópico

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este capítulo describe el procedimiento de referencia para la enumeración de células somáticas en la leche cruda.

Asimismo, especifica el procedimiento para la enumeración del número de células en una muestra de leche, con objeto de calibrar y comprobar la exactitud del método fluoroptoelectrónico (véase B.1).

2. Definición

Por lo que respecta al presente procedimiento, se entenderá por células somáticas aquellas células (por ejemplo, los leucocitos y las células epiteliales) cuyos núcleos pueden teñirse claramente utilizando azul de metileno.

3. Principio

Extender 0,01 ml de leche en una superficie de 1 cm² de un portaobjetos. Dejar secar la película y teñir. Efectuar el recuento utilizando un microscopio. Para obtener el número de células/ml, multiplicar por el factor de trabajo el número de células somáticas de un área determinada.

4. Reactivos

Utilizar productos químicos puros para análisis.

Solución colorante:

Composición:

Azul de metileno	0,6 g
Etanol al 99%	54 ml
1,1,1-tricloroetano o tetracloroetano	40 ml
Ácido acético glacial	6 ml

Advertencia:

El tetracloroetano es venenoso. Si se utiliza, la preparación y aplicación deberán realizarse en una campana de gases.

Preparación:

Mezclar en un frasco el etanol y el 1,1,1-tricloroetano o tetracloroetano y calentar en un baño de agua a 60-70°C. Añadir el azul del metileno y mezclar cuidadosamente; enfriar en un refrigerador a 4°C de temperatura durante un período de 12 a 24 horas y añadir el ácido acético glacial. Filtrar utilizando un filtro de tamaño de poro de 10 a 12 micras como máximo, y almacenar la solución colorante en un frasco hermético. Filtrar de nuevo antes del uso si se forman partículas o sedimentos.

5. Aparatos y material de vidrio

5.1. Microscopio de 500 a 1 000 aumentos.

5.2. Microjeringa de 0,01 ml con una precisión mínima de $\pm 2\%$.

- 5.3. *Portaobjetos* en el que se habrá delimitado una superficie de 20 mm × 5 mm para la película, o un portaobjetos ordinario y una plantilla de 20 mm × 5 mm para la película.
- 5.4. *Placa de calentamiento nivelada* (30 a 50°C) para secar los portaobjetos.
- 5.5. *Ventilador* (secador) para secar la película.
- 5.6. *Baño de agua* para calentar la muestra de leche, que pueda alcanzar una temperatura de 30-40°C.
- 5.7. *Micrómetro de portaobjetos*, con divisiones de 0,01 mm.
6. **Procedimiento**
- 6.1. *Muestra de leche*
La muestra de leche deberá analizarse dentro de las 6 horas siguientes al muestreo. La temperatura de las muestras durante el almacenamiento no deberá sobrepasar los 6°C. Se evitará la congelación.
- 6.2. *Preparación de la muestra en el laboratorio*
Calentar las muestras en un baño de agua (5.6) a una temperatura de 30-40°C. Mezclar cuidadosamente. Enfriar hasta alcanzar la temperatura a la que se haya calibrado la microjeringa (5.2), por ejemplo, 20°C.
- 6.3. *Tratamiento previo de los portaobjetos*
Limpiar los portaobjetos (5.3) utilizando, por ejemplo, etanol; secar con un papel exento de polvo, flamear y enfriar. Conservar en una caja al abrigo del polvo.
- 6.4. *Preparación de las películas*
Extraer 0,01 ml de leche de la muestra preparada como se indica anteriormente con ayuda de una microjeringa (5.2). Limpiar cuidadosamente la parte exterior de la jeringa que esté en contacto con la leche. Colocar la jeringa en el portaobjetos (5.3), siguiendo, en primer lugar, el contorno (20 mm × 5 mm) y, a continuación, llenar la superficie interior con la mayor uniformidad posible. Secar la película en una placa de calentamiento nivelada (5.4) hasta que esté totalmente seca.
Preparar y analizar, como mínimo, dos películas de cada muestra de leche.
- 6.5. *Teñido de las películas*
Bañar en la solución colorante (4) durante 10 minutos. Secar, utilizando un ventilador (5.5) si fuese necesario. Bañar las películas en agua corriente hasta la eliminación de todo el colorante superfluo. Secar de nuevo y almacenar al abrigo del polvo.
- 6.6. *Calibrado del campo microscópico*
En función del aumento elegido (× 500— × 1 000), determinar el diámetro del campo microscópico con ayuda del micrómetro de portaobjetos (5.7).
7. **Recuento a cálculo**
- 7.1. *Recuento de células*
Empiear un microscopio (5.1). Hacer únicamente el recuento de los núcleos de células, no de éstas. Los núcleos se distinguen fácilmente y, para considerarlos en el recuento, debe verse en el campo del microscopio al menos su mitad.
Hacer el recuento de franjas o campos situados en el tercio central de la película, y evitar el recuento de franjas o campos seleccionados exclusivamente de los márgenes de las películas. Comprobar al menos una vez al mes, mediante el recuento de diferentes partes de las películas, que la preparación de éstas es adecuada y que, en consecuencia, los resultados son fiables. El recuento también puede efectuarse contando los campos microscópicos distribuidos de tal manera que todas las partes de la película se hallen igualmente representadas.
- 7.2. *Número mínimo de células que deben contarse*
Dado que el recuento microscópico de células somáticas puede emplearse también para la normalización de procedimientos automáticos y mecanizados de recuentos, el coeficiente de variación de recuentos de muestras idénticas no deberá ser superior al de los instrumentos electrónicos. El coeficiente de variación de una muestra de leche que contenga entre 400 000 y 600 000 células/ml no sobrepasará el 5%.

De acuerdo con las características de la distribución de Poisson, en cada muestra deberá someterse a recuento un mínimo de 400 células somáticas para poder obtener una determinada repetibilidad.

La distribución de Poisson presupone que:

$$M = V = s^2,$$

siendo:

M = media

V = variación

s = desviación típica.

La fórmula del coeficiente de variación es la siguiente:

$$CV = \frac{s \times 100\%}{M} \text{ o } CV = \frac{100\%}{s} \text{ o } CV = \frac{100\%}{\sqrt{M}}$$

M = (media) indica el número de partículas (células) contadas (por ejemplo, 400 para CV = 5%).

7.3. *Cálculo del factor de trabajo*

Para 0,01 ml de leche, el factor de trabajo se calcula según los apartados 7.3.1 o 7.3.2.

7.3.1 Recuento de franjas en la película:

Se efectuará el recuento de franjas de 5 mm de longitud. La anchura de una franja corresponde al diámetro del campo del microscopio, determinado con el micrómetro de portaobjetos (5.7).

$$\text{Factor de trabajo} = \frac{20 \times 100}{d \times b}$$

siendo:

d = diámetro del campo del microscopio, expresado en milímetros, determinado mediante el micrómetro de portaobjetos (5.7),

b = número de franjas sometidas a un recuento completo.

7.3.2. Recuento de campos de microscopio en el tercio central de la película o mediante una rejilla:

$$\text{Factor de trabajo} = \frac{20 \times 5 \times 100}{\frac{\pi \times d^2 \times s}{4}} = \frac{12\,732}{d^2 \times s}$$

siendo:

d = diámetro del campo del microscopio, expresado en milímetros, determinado mediante el micrómetro de portaobjetos (5.7),

s = número de campos contabilizados.

7.4. *Cálculo del contenido en células*

Para obtener el contenido en células por mililitro de leche, multiplicar el número de células somáticas contabilizadas (7.1 y 7.2) por el factor de trabajo (7.3).

7.5. *Precisión*

El coeficiente de variación (véase el apartado 7.2) no sobrepasará el 5%.

Aún no se dispone de resultados de ensayos multicentro aceptados internacionalmente con respecto a la precisión.

B. *Método fluor-opto-electrónico*

1. *Objeto y ámbito de aplicación*

El presente capítulo describe el procedimiento de referencia que, tras efectuar el correspondiente calibrado (véase el apartado A.1), puede utilizarse para el recuento de células somáticas en la leche cruda, con adición de conservantes químicos o sin ella.

2. Definición

En lo que respecta al presente procedimiento, se entiende por células somáticas las partículas que presentan una intensidad de fluorescencia mínima debido a la coloración del ADN del núcleo de las células somáticas.

3. Principio

Mezclar cuidadosamente una parte de la muestra (por ejemplo, 0,2 ml) con solución amortiguadora y solución fluorescente. Transferir, en forma de una delgada película, parte de esta muestra a un disco giratorio, que se utiliza como platina del microscopio.

Cada célula produce un impulso eléctrico que se amplía y registra. El número de células somáticas se expresa en miles por mililitro.

4. Reactivos

Utilizar productos químicos puros para análisis, a menos que se indique lo contrario. Utilizar agua destilada o desionizada, o bien agua de pureza equivalente.

4.1. Solución amortiguadora

Composición:

Ftalato ácido potásico	51,0 g
Hidróxido potásico	13,75 g
Polietilenglicol-mono-p- (1,1,3,3-tetrametilbutil) -fenil-éter (por ejemplo, Triton X-100), al 1 % en volumen pH 5,7-5,9. Añadir agua hasta 10 000 ml.	10,0 ml

Preparación:

Mezclar los distintos componentes. El almacenaje, en recipientes herméticos, no deberá sobrepasar los 7 días.

4.2. Solución fluorescente (solución madre)

Composición:

Bromuro de etidio	1,0 g
Añadir agua hasta 1 000 ml.	

Preparación:

Disolver el bromuro de etidio en agua. Almacenar en un frasco opaco y hermético durante 2 meses como máximo.

4.3. Solución fluorescente (solución de trabajo)

Mezclar 20 ml de la solución madre (4.2) con la solución amortiguadora (4.1) hasta obtener 1 000 ml. La solución de trabajo no deberá emplearse durante más de 7 días.

4.4. Solución limpiadora

Composición:

Solución amortiguadora (4.1)	10,0 ml
Polietilenglicol-mono-p- (1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil-éter (por ejemplo Triton X-100) al 1 % en volumen	10,0 ml
Amoníaco al 25 % en volumen	25,0 ml
Añadir agua hasta 10 000 ml	

Preparación:

Mezclar los distintos componentes. El período de almacenamiento no deberá sobrepasar los 30 días.

5. Equipo y material de vidrio

5.1. Aparato de recuento que funcione de acuerdo con el principio óptico de la fluorescencia.

Nota:

Calibrar el aparato antes de utilizarlo. Determinar así la relación entre el volumen de las partículas que deben someterse a recuento y el nivel umbral por encima del cual se efectúa éste. Calibrar el aparato de acuerdo con las instrucciones del fabricante, empleando muestras cuyo contenido en células haya sido determinado previamente por el método microscópico (A).

- 5.2. *Baño de agua* de circulación, que pueda funcionar a $40 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 5.3. *Tubo de ensayo* con un cierre adecuado, de 15 ml de capacidad aproximadamente.
6. **Muestra de leche**
- 6.1. Almacenar la muestra en un tubo de muestras (5.3) a baja temperatura. Si la muestra no contiene conservantes químicos, el recuento no deberá efectuarse en las 24 horas siguientes al ordeño, ya que daría resultados demasiado bajos. La temperatura de almacenamiento no deberá sobrepasar 6°C .
- 6.2. *Adición de conservantes*
- La adición de conservantes químicos deberá realizarse en un plazo de 24 horas.
- La adición de conservantes deberá efectuarse lo antes posible después del muestreo.
- 6.2.1. Podrá añadirse a las muestras uno de los siguientes conservantes químicos:
- ácido ortobórico
La concentración final de ácido ortobórico de la muestra no deberá sobrepasar 0,6 g/100 ml. La muestra que contenga este conservante podrá almacenarse durante 24 horas más, a una temperatura comprendida entre 6 y 12°C .
 - dicromato potásico
La concentración final de dicromato potásico no será mayor de 0,2 g/100 ml. Las muestras que contengan este conservante podrán almacenarse durante 72 horas más, a una temperatura comprendida entre 6 y 12°C .
 - azida sódica
Podrá añadirse azida sódica a las muestras, con una concentración final de 0,024 g/100 ml, siempre que las muestras se refrigeren a una temperatura comprendida entre 6 y 12°C inmediatamente después del muestreo y que el recuento se realice dentro de las 48 horas después de éste.
 - bronopol
Podrá añadirse bronopol a las muestras con una concentración final de 0,05 g/100 ml, siempre que la muestra se enfríe a una temperatura comprendida entre 6 y 12°C inmediatamente después del muestreo, y que el recuento se efectúe dentro de las 72 horas siguientes a éste.
- 6.2.2. Las muestras que ya contengan ácido ortobórico, podrán conservarse hasta 48 horas más mediante la adición de dicromato potásico.
- Nota:*
En lo que se refiere a las muestras que contengan dicromato potásico, deberán observarse las condiciones locales que afecten a la evacuación de efluentes.
7. **Procedimiento**
- 7.1. *Tratamiento previo de las muestras*
- La leche para análisis deberá almacenarse después del ordeño durante 24 horas como mínimo a una temperatura comprendida entre 2 y 6°C aproximadamente. No es aconsejable realizar el recuento de muestras el mismo día del ordeño sin haber efectuado un tratamiento previo, ya que los resultados pueden ser demasiado bajos. Si fuese necesario realizar el recuento de una de estas muestras, se la someterá a un tratamiento previo durante 3 horas como mínimo con dicromato potásico (véase 6.2.1).
- 7.2. *Preparación*
- Calentar en un baño de agua (5.2), a una temperatura de 40°C aproximadamente, la muestra sometida a un tratamiento previo (véase el apartado 7.1) o una muestra no tratada obtenida, como mínimo, el día anterior. A continuación, mantener la muestra a temperatura ambiente hasta que se efectúe el recuento.
- 7.3. *Recuento de células*
- Realizar el recuento utilizando el correspondiente aparato (5.1) dentro de los 15 minutos siguientes al calentamiento (véase el apartado 7.2). Inmediatamente antes de efectuar el recuento, mezclar cuidadosamente las muestras, con objeto de obtener una distribución de las células somáticas lo más homogénea posible.
- El aparato efectuará automáticamente nuevas diluciones y preparaciones de las muestras.

8. Precisión

No se dispone de cifras de ensayos multicentro para la repetibilidad (r) y la reproducibilidad (R). En el futuro, se determinarán datos de precisión.

Los datos disponibles a nivel nacional permiten efectuar las siguientes estimaciones:

Contenidos en células comprendidas entre 400 000 y 500 000/ml:

— desviación típica para la repetibilidad:

$$s_r = 20\,000 \text{ células/ml (equivalente a un coeficiente de variación de } 5\% - 4\%)$$

— desviación típica para la reproducibilidad:

$$s_R = 40\,000 \text{ células/ml (equivalente a un coeficiente de variación del } 10 - 8\%).$$

9. Control de la exactitud

El control de la exactitud se efectúa en un laboratorio nacional de referencia utilizando muestras de un contenido en células conocido (P), determinado mediante recuentos microscópicos de células.

VIII. DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS Y SULFAMIDAS

OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente capítulo describe el procedimiento de referencia para la detección de antibióticos y de sulfamidas en la leche cruda y tratada térmicamente.

El procedimiento de referencia comprende:

A. Procedimiento cualitativo

Se trata del procedimiento inicial para seleccionar muestras de leche que contengan antibióticos, incluidas las sulfamidas. Existen varios procedimientos similares al propuesto; todos ellos utilizan, en principio, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 como organismo de ensayo. El procedimiento elegido se considera representativo de estos ensayos.

B. Procedimiento para la confirmación e identificación de la penicilina

Se utilizará para confirmar los resultados del procedimiento cualitativo, identificar la penicilina y determinar su concentración.

A. Procedimiento cualitativo

1. Objeto y ámbito de aplicación

El procedimiento que se expone a continuación describe la detección cualitativa, en la leche cruda y tratada térmicamente, de antibióticos y sulfamidas en concentraciones que sobrepasen los límites establecidos en el siguiente cuadro:

Concentraciones detectables de diversos antibióticos y sulfamidas (1)

	Sensibilidad del ensayo	
	Negativo	Positivo
Bencilpenicilina	0,002	0,006
Ampicilina	0,002	0,005
Cloxacilina	0,015	0,035
Nafcilina	0,006	0,011
Tetraciclina HCL	0,10	0,40
Oxitetraciclina	0,20	0,45
Clortetraciclina	0,15	0,50
Cloranfenicol	7	15
Dihidroestreptomina	4	13
Neomicina	1	22
Kanamicina	9	28
Bacitracina	0,06	0,14
Eritromicina	1	2,25
Rifamicina	0,01	0,14
Diafenilsulfona	0,01	0,1
Sulfameticina (Sulfadimidina)	0,5	1

(1) La bencilpenicilina y la bacitracina se expresan en UI/ml y los restantes antibióticos en µg/ml.

2. Definición

La leche contiene antibióticos o sulfamidas cuando no se modifica el color del medio (véase el apartado 7.1).

3. Principio

Añadir una muestra de leche y nutrientes a un gel de agar que contenga un indicador de pH y esporas de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (véase el apartado 5.4.1), de buena sensibilidad global y, en particular, a la inhibición por penicilina. La incubación que origina un crecimiento normal y la producción de ácido por el organismo da lugar a que el color del indicador de pH cambie de púrpura a amarillo. Si en la leche hay sustancias inhibidoras del crecimiento del organismo, no se modifica el color púrpura del indicador de pH.

4. Aparatos y material de vidrio

Material ordinario de laboratorio y, en particular:

4.1. Aparatos

- 4.1.1. Estufa que pueda mantener una temperatura de $64 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 4.1.2. Baño de agua que pueda funcionar a una temperatura de $64 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 4.1.3. Gradilla para los tubos o ampollas.
- 4.1.4. Pipeta con puntas desechables de un solo uso, adecuado para el muestreo y distribución en dosis de 0,1 ml.
- 4.1.5. Fórceps o pinzas.
- 4.1.6. Horno de aire caliente que pueda funcionar a una temperatura comprendida entre 170°C y 175°C .
- 4.1.7. Autoclave que pueda funcionar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 4.1.8. pH-metro.

4.2. Material de vidrio.

- 4.2.1. Frascos de muestreo con cierres adecuados.

Nota:

Algunos tapones de goma pueden depositar sustancias inhibidoras en el cuello del frasco.

- 4.2.2. Placas de Petri de vidrio claro incoloro o de material sintético estéril, con fondo plano de espesor uniforme y de un diámetro interior mínimo de 140 mm aproximadamente.
- 4.2.3. Frascos de 250 ml de capacidad.
- 4.2.4. Pipetas (taponadas con algodón) de vidrio o material sintético estéril, de capacidad nominal de 1 ml y 10 ml.
- 4.2.5. Espátulas de vidrio
- 4.2.6. Tubos o ampollas de un diámetro interior de 8 mm aproximadamente, con tapas o tapones.
- 4.2.7. Esterilización del material de vidrio:
El material de vidrio se esterilizará empleando uno de los métodos siguientes:
 - a) manteniéndolo a una temperatura comprendida entre 170 y 175°C en un horno de aire caliente (4.1.6) durante 1 hora como mínimo;
 - b) manteniéndolo a una temperatura de $121 \pm 1^\circ\text{C}$ en un autoclave (4.1.7) durante 20 minutos como mínimo.

Comprobar que el vapor penetre adecuadamente en el autoclave, es decir, si se utilizan recipientes para la esterilización del material, éstos no deberán cerrarse herméticamente; las tapas de los matraces y frascos deberán estar sueltas.

El material de vidrio esterilizado en autoclave deberá secarse haciendo salir el vapor.

Las pipetas se esterilizarán en un horno de aire caliente.

5. Medios, soluciones, organismo de ensayo

Los ingredientes de los medios deben ser adecuados para los ensayos bacteriológicos. Utilizar agua destilada, desmineralizada, o, al menos, de pureza equivalente, exenta de sustancias inhibidoras de microorganismos.

- 5.1. *Medios*
- 5.1.1. Agar nutritivo
- Composición:
- | | |
|----------------------|----------|
| Extracto de levadura | 2 g |
| Peptona | 5 g |
| Extracto de carne | 1 g |
| Cloruro sódico | 5 g |
| Agar | 10-15 g |
| Agua | 1 000 ml |
- Preparación:
- Disolver los componentes en agua. Llevar a ebullición, removiendo esporádicamente. Ajustar el pH de modo que tras la esterilización sea de $7,4 \pm 0,1$ a 25°C .
- Distribuir fracciones de 10 ml en tubos de ensayo para obtener un cultivo de agar inclinado, o de 100 ml en frascos.
- Esterilizar a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.
- 5.1.2. Medio de agar
- Composición:
- | | |
|--|----------|
| Cloruro sódico | 2 g |
| Agar | 15 g |
| Agua | 1 000 ml |
| Solución de trimetoprima o tetroxoprima (véase 5.1.3) ⁽¹⁾ | 10 ml |
- Preparación:
- Disolver los componentes en agua, excepto la trimetoprima o tetroxoprima. Llevar a ebullición removiendo esporádicamente. Añadir la trimetoprima y esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos; ajustar el pH de modo que tras la esterilización sea de $7,0 \pm 0,1$ a 25°C .
- 5.1.3. Solución de trimetoprima
- | | |
|----------------|--------------|
| Trimetoprima | 5 mg |
| o tetroxoprima | 30 mg |
| Etanol al 96 % | (5 ml/30 ml) |
| Agua | 1 000 ml |
- Disolver la trimetoprima o tetroxoprima en etano (5 o 30 ml) y diluir con agua.
- 5.1.4. Nutriente
- | | |
|------------------------|---------|
| Extracto de levadura | 0,75 mg |
| Glucosa | 5,0 mg |
| Almidón soluble | 8,0 mg |
| Púrpura de bromocresol | 0,025 g |
| Agua hasta | 50 ml |
- Disolver en agua los nutrientes y el indicador, calentando si es necesario. El nutriente se presenta comercialmente en tabletas.
- 5.2. *Soluciones patrón de penicilina*
- 5.2.1. Preparar una *solución de penicilina* de $60 \mu\text{g/ml} = (100 \text{ UI/ml})$, disolviendo bencilpenicilina sódica o potásica cristalina en agua destilada estéril dentro de un frasco estéril con un cierre adecuado.
- 5.2.2. Preparar una *solución de trabajo de penicilina*, llevando 1,25 ml de la solución de penicilina (5.2.1) hasta 1 000 ml con agua destilada estéril. Esta solución de trabajo contiene $0,075 \mu\text{g/ml} (= 0,125 \text{ UI/ml})$.
- 5.2.3. Preparar 75 ml de una *solución patrón de penicilina* que contenga $0,004 \mu\text{g/ml} (= 0,0067 \text{ UI/ml})$ de penicilina, añadiendo 71 ml de leche exenta de sustancias inhibitorias (5.3) a 4 ml de la solución de trabajo de penicilina (5.2.2); mezclar a continuación.

⁽¹⁾ La utilización de medios de cultivo que contienen sustancias antifolatos deben respetar las reglas relativas a las patentes que los amparan.

- 5.2.4. Preparar las soluciones de penicilina citadas en 5.2.1 a 5.2.3 el mismo día que se efectúe el análisis.
- 5.3. *Leche exenta de sustancias inhibidoras*
Preparar como solución de control *leche exenta de sustancias inhibidoras*, reconstituyendo leche desnatada en polvo (10% m/v) previamente analizada y declarada exenta de sustancias inhibidoras, en agua destilada estéril. Si se prefiere, distribuir en frascos y calentar durante una hora a 100°C una cantidad suficiente de leche fresca a granel, que se habrá analizado y declarado exenta de sustancias inhibidoras; a continuación, almacenar en un refrigerador a una temperatura comprendida entre 0 y 6°C durante una semana como máximo.
- 5.4. *Organismo de ensayo*
- 5.4.1. Utilizar como organismo de ensayo *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactus*, cepa ATCC 10149. Esta cepa es idéntica a la C 953.
- 5.4.2. Preparar un *cultivo madre* para mantener el cultivo de ensayo. Conservar este último en un cultivo de agar nutritivo inclinado (5.1.1). Sembrar por estría en la superficie del agar inclinado, haciendo uso de un asa del cultivo de ensayo, e incubar aeróbicamente durante 48 horas a $63 \pm 1^\circ\text{C}$. Tras la incubación, sellar el tubo utilizando un tapón estéril de goma. El cultivo madre obtenido puede conservarse en un refrigerador a 0°-5°C durante varios meses.
- 5.5. *Cultivo de ensayo (suspensión de esporas)*
- 5.5.1. Transferir asépticamente a una placa de Petri (4.2.2) estéril 20 ml de agar nutritivo (5.1.1) fundido y enfriar a temperatura ambiente.
- 5.5.2. Transferir con una pipeta (4.2.4) estéril 5 ml de agua destilada estéril a un tubo que contenga cultivo madre (5.4.2) y separar las esporas del agar inclinado utilizando un asa estéril. La suspensión de esporas se mantendrá a 0°-5°C y se utilizará dentro de las 36 horas siguientes.
- 5.5.3. Transferir con una pipeta (4.2.4) estéril 0,5 ml de la suspensión de esporas (5.5.2) a una placa de cultivo (5.5.1); extender uniformemente el inóculo sobre toda la superficie con ayuda de un cayado de vidrio. Incubar a $63 \pm 1^\circ\text{C}$ (4.1.1) de 16 a 18 horas.
Si se utiliza un cultivo (5.4.2) o un cultivo preparado más de 36 horas antes, efectuar el procedimiento de subcultivo al menos 2 veces, sin dejar transcurrir intervalos de más de 36 horas entre los subcultivos.
- 5.5.4. Transferir a la placa de cultivo (4.2.4) 10 ml de agua destilada con ayuda de una pipeta (4.2.4) estéril y recoger las esporas de la superficie con una varilla de vidrio.
Transferir la suspensión de esporas a un frasco (4.2.3) que contenga 250 ml de agua destilada estéril. Cerrar el frasco y agitar enérgicamente. Si no está previsto hacer subcultivos inmediatamente, almacenar los cultivos en un refrigerador a 0°-6°C
- 5.5.5. La suspensión de esporas presentará un recuento de colonias viables comprendido entre 5 y 10 millones por ml en un medio de agar de recuento en placa incubado a $63 \pm 1^\circ\text{C}$ entre 16 y 18 horas. La suspensión de esporas presentará una turbidez uniforme. Se desechará si contiene grumos o sedimentos, y se preparará una nueva suspensión con el cultivo madre (5.4.2).
- 5.6. *Preparación de tubos de ensayo o ampollas*
- 5.6.1. Fundir el medio de agar (5.1.2) y enfriar a 55°C.
- 5.6.2. En un tubo o frasco, añadir una parte de suspensión de esporas recién preparada (5.5.4) a 5 partes del medio de agar (5.6.1) y mezclar cuidadosamente.
- 5.6.3. Transferir a un tubo o ampolla (5.6.2) estéril 0,3 ml de los medios sembrados (5.6.2), de modo que se obtenga una capa de 5 mm de espesor; cerrar con un tapón, una tapa o fundiendo la abertura, y dejar enfriar los tubos de ensayo o las ampollas en posición vertical; dejar que el medio solidifique y que, a continuación, repose durante 12 horas como mínimo.
- 5.6.4. Los tubos de ensayo o ampollas pueden utilizarse el mismo día; también pueden guardarse durante varios meses si se enfrían inmediatamente después de la preparación y se mantienen a una temperatura de 0°-6°C.
6. *Procedimiento*
- 6.1. Analizar las muestras lo antes posible y, preferentemente, dentro de las 24 horas siguientes al muestreo; durante este intervalo de tiempo, mantener las muestras a una temperatura entre 0 y 5°C. Si no es posible analizar las muestras dentro de las 24 horas siguientes, mantenerlas ultracongeladas (de -30 a -15°C) para minimizar la inactivación de la penicilina.

- 6.2. Identificar los tubos o ampollas (5.6) de forma legible e indeleble. Quitar la tapa o tapón. Colocar el número necesario para las muestras y controles (5.2 y 5.3) que vayan a examinarse en una gradilla apropiada (4.1.3).
- 6.3. Añadir a cada tubo o ampolla 50 microlitros del nutriente citado en el apartado 5.1.4.
- 6.4. Mezclar a fondo la muestra de leche y transferir 0,1 ml al tubo o ampolla etiquetado correspondiente, con ayuda de una jeringa (4.1.4). Utilizar una aguja limpia y desechable cada vez.
- 6.5. Repetir la operación descrita en el apartado 6.4, utilizando la solución patrón de penicilina de 0,004 µg/ml (0,0067 UI/ml) en lugar de la muestra de leche (5.2.3).
- 6.6. Realizar otra vez la operación descrita en 6.4, utilizando, en lugar de la muestra de leche, el control de leche exenta de sustancias inhibitoras (5.3).
- 6.7. Cerrar los tubos o ampollas y colocar la gradilla que los contenga en un baño de agua a $63 \pm 1^\circ\text{C}$ (4.1.2) donde permanecerá, como mínimo, entre 2 horas y media y 2 horas y tres cuartos.
- 6.8. Sacar del baño de agua la gradilla con los tubos o ampollas.
- 6.9. Observar el color del medio de ensayo (véase 7).

7. Interpretación de los resultados

- 7.1. La coloración púrpura del medio de ensayo de cualquier muestra de leche, tubo o ampolla de control indica la presencia en la muestra de antibióticos o sulfamidas en concentraciones iguales o próximas al nivel «positivo» que figura en el cuadro de la página 39. Los tubos o ampollas que contengan la solución patrón de penicilina (6.5) mantendrán su coloración púrpura, que será indicio de que el medio de ensayo tiene la sensibilidad suficiente.
- 7.2. Si sólo una parte del medio de ensayo presenta una coloración púrpura, o si los tubos o ampollas de muestras de leche presentan una coloración irregular, podrá deducirse la presencia en la muestra de sustancias inhibitoras comprendidas entre los niveles que figuran en el cuadro de la página 39.
- 7.3. La coloración amarilla del medio de ensayo de los tubos o ampollas de muestras de leche o de control indica la ausencia de sustancias inhibitoras del organismo de ensayo.
- 7.4. Si existe una coloración púrpura en todos los tubos y ampollas analizados, incluido el control negativo, ello indica que los tubos o ampollas no contienen esporas viables, por lo que las muestras deben analizarse de nuevo utilizando materiales de análisis recién preparados.

8. Confirmación de los resultados

- 8.1. Confirmar todas las muestras con reacciones como las descritas en los apartados 7.1 y 7.2 de acuerdo con el «Método B». Si fuera necesario almacenar las muestras de leche antes de efectuar la confirmación, deberán conservarse ultracongeladas para evitar la degradación de los antibióticos.

B. Método para la confirmación de penicilinas y la determinación de su concentración

1. Objeto y ámbito de aplicación

El presente procedimiento describe el ensayo de confirmación de penicilinas o antibióticos distintos de las penicilinas, y el procedimiento para la determinación de la concentración de penicilinas en muestras de leche que presenten una reacción positiva (A.7.1) o dudosa (A.7.2).

Sensibilidad del método con distintos antibióticos

Véase el apartado A.1.

2. Definición

- 2.1. La muestra de leche *contiene antibióticos, incluidas las sulfamidas*, si, al aplicar el método descrito, la muestra produce una zona clara de inhibición de al menos 2 mm alrededor del disco.

2.2. Si una muestra que contiene antibióticos, incluidas las sulfamidas (2.1), y a la que se ha añadido posteriormente penicilinas (betalactamasas) no forma una zona clara o bien forma una zona clara de diámetro más pequeño que sin la presencia de la penicilinas, podrá deducirse que la *sustancia inhibidora es bien penicilina, o bien penicilina y otro antibiótico, incluidas las sulfamidas.*

2.3. Si la zona no puede inactivarse con penicilinas (2.2) la sustancia inhibidora en la muestra de leche *no es la penicilina, aunque puede ser también otro residuo* [véase la letra b) del apartado 2 y la letra f) del apartado 1 del punto A del capítulo VI del Anexo A de la Directiva 85/397/CEE].

Algunas de las penicilinas semisintéticas como, por ejemplo, la cloxacilina sódica, no pueden identificarse como penicilina (véase el apartado 7.3) por ser totalmente resistentes a la penicilinasas o por no poder ser inactivadas, o sólo parcialmente, por ésta.

3. Principio

Colocar un disco de papel absorbente impregnado de la leche que se desee examinar sobre la superficie de un medio de agar sembrado de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. La incubación que da lugar a un crecimiento normal del organismo hace que el agar se enturbie. La aparición de una zona clara alrededor del disco indica la presencia en la leche de sustancias inhibidoras del crecimiento de los organismos. El tamaño de la zona clara depende, entre otros factores, de la concentración y del tipo de sustancias inhibidoras presentes en la leche.

4. Aparatos, material de vidrio y equipo

4.1. Aparatos

4.1.1. Véase el apartado A.4.1.

4.1.2. Baño maría, regulable a $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.2. Material de vidrio

Véase el apartado A.4.2.

4.3. *Discos de papel* (almacenados, preferiblemente, en un desecador) exentos de sustancias inhibidoras, de 9 a 13 mm de diámetro, que puedan absorber aproximadamente 130 mg de leche.

5. Medios, soluciones patrón, solución de penicilinas, reactivos, organismo de ensayo, etc.

Los ingredientes de los medios deben ser adecuados desde el punto de vista bacteriológico. Utilizar agua destilada, desmineralizada, o de pureza equivalente, como mínimo, exenta de sustancias inhibidoras de los microorganismos.

5.1. Medios

5.1.1. Agar nutritivo (A.5.1.1)

5.1.2. Medio de análisis para la detección de sustancias inhibidoras

Composición:

Extracto de levadura	2,5 g
Triptona	5 g
Glucosa	1 g
Solución de trimetoprim (A.5.1.3)	10 ml
Agar	10-15 g (según la calidad de gelificación)
Agua	1 000 ml

Preparación:

Antes de añadir la solución de trimetoprima o tetroxoprima, disolver totalmente los componentes sólidos en agua, mediante calentamiento y agitación. Después de añadir la solución de trimetoprima o tetroxoprima, ajustar el valor del pH de modo que, tras la esterilización, sea de $8,0 \pm 0,1$ a 25°C . Esterilizar el medio durante 15 minutos a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.2. Soluciones patrón de penicilina

Véase el apartado A.5.2.

Para cuantificar las sustancias inhibidoras (8) preparar soluciones patrón de penicilina en leche exenta de sustancias inhibidoras (A.5.3), de las siguientes concentraciones:

- a) 0,004 µg/ml (0,0067 UI/ml),
- b) 0,006 µg/ml (0,01 UI/ml),
- c) 0,03 µg/ml (0,05 UI/ml),
- d) 0,06 µg/ml (0,1 UI/ml).

5.3. Soluciones de penicilinas

- 5.3.1. Disolver en agua destilada estéril la cantidad suficiente de penicilinas (betalactamasas) para obtener una concentración de 1 000 U/ml. La solución, dividida de preferencia en porciones pequeñas, puede almacenarse a 0°-5°C durante 4 semanas como máximo.

Nota:

No existe un patrón internacional uniforme para la penicilinas. Por lo que concierne al presente procedimiento, se considera que 10 unidades de penicilinas son suficientes para inactivar 0,6 µg (= 1 UI) de penicilina. En lo que respecta a partidas de penicilinas de actividad desconocida, comprobar si se cumple la afirmación anterior. De lo contrario, modificar en consecuencia la concentración de la solución de penicilinas.

- 5.3.2. Podrán utilizarse discos comerciales preparados con penicilinas en lugar de la solución de esta sustancia si, tras efectuar el control oportuno, se comprueba que contienen una cantidad adecuada de penicilinas.

5.4. Organismo de ensayo

Véase el apartado A.5.4.

5.5. Cultivo de ensayo (suspensión de esporas)

Véase el apartado A.5.5.

5.6. Preparación de las placas de análisis

- 5.6.1. Fundir el medio de análisis para la detección de sustancias inhibidoras (5.1.2) y enfriar a 55°C.
- 5.6.2. En un frasco, añadir una parte de la suspensión de esporas recién preparada (5.5) al número de partes del medio de análisis para la detección de sustancias inhibidoras (5.1.2) que se considere necesario para obtener una densidad adecuada de colonias en el medio de análisis sembrado, y mezclar cuidadosamente.
- 5.6.3. Transferir el medio de análisis sembrado (5.6.2) a una placa Petri (A.4.2.2) estéril, calentada previamente a 55°C, de modo que se forme una capa de 0,6-0,8 mm de espesor. Para obtener un espesor de 0,8 mm en una placa de Petri de 140 mm de diámetro interior, son necesarios, aproximadamente, 15 ml del medio de ensayo.
- 5.6.4. Transferir las placas Petri a una superficie fría horizontal, previamente comprobada mediante un nivel de burbuja de aire; quitar las tapas y dejar solidificar el medio de agar. Cuando haya solidificado, colocar de nuevo las tapas en las placas, que se invertirán para minimizar la condensación en la superficie del medio de agar.
- 5.6.5. Utilizar, preferentemente, las placas de análisis el mismo día de su preparación, aunque podrán conservarse dos semanas, como máximo, si, inmediatamente después de su preparación, se guardan a 5°C en una bolsa de polietileno sellada.
- 5.6.6. Marcar el fondo de las placas de análisis con objeto de identificar las muestras.

6. Procedimiento

6.1. Preparación de la muestra

- 6.1.1. Analizar de nuevo, identificar y cuantificar como penicilina las muestras que den resultados positivos o dudosos con el «Método A» (A.7.1 y A.7.2).
- 6.1.2. Al principio, calentar las muestras de leche a una temperatura de $80 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 minutos, con objeto de evitar la influencia de sustancias inhibidoras termolábiles no específicas.
- 6.1.3. Mezclar cuidadosamente y, a continuación, transferir a un frasco estéril de boca ancha 10 ml aproximadamente de la leche calentada. Añadir a la leche 0,4 ml aproximadamente de la solución de penicilinas (5.3) y mezclar cuidadosamente.

- 6.2. *Detección de sustancias inhibitoras*
- 6.2.1. Empapar en la muestra de leche (6.1.2) un disco de papel (4.3) con ayuda de unos fórceps limpios y secos. Eliminar el exceso de leche tocando con el disco un lado del frasco de muestras. Extender el disco sobre la superficie de la placa de análisis (5.6) y apretar suavemente con los fórceps.
- 6.2.2. Los discos de las distintas muestras de leche deberán colocarse a 20 mm de distancia entre sí y a 10 mm del borde, como mínimo.
- 6.2.3. Con objeto de comprobar la sensibilidad, colocar aleatoriamente entre los discos de muestras de leche discos (4.3) que contengan soluciones patrón de penicilina [5.2.a)], en una proporción del 2%, como mínimo, con respecto a los primeros; se utilizarán como mínimo 5 discos patrón durante cada análisis.
- 6.2.4. Cuando todos los discos se hayan colocado aleatoriamente en el medio de agar y hayan sido identificados, invertir las placas e incubar a una temperatura de $63 \pm 1^\circ\text{C}$ de 2 horas y media a 5 horas.
- 6.2.5. Tras la incubación, examinar las placas con luz adecuada para detectar las zonas claras de inhibición alrededor de los discos de papel. Medir dichas zonas.
- 6.2.6. Habrá zonas de al menos 2 mm alrededor de los discos que contengan la solución patrón de penicilina (6.2.3).
- 6.2.7. La presencia de zonas claras de un tamaño igual o superior al de las mencionadas en 6.2.6 alrededor de los discos que contengan muestras de leche indica la existencia de sustancias inhibitoras del organismo de análisis.
- 6.3. *Identificación y cuantificación de la sustancia inhibitora*
- 6.3.1. Realizar de nuevo el procedimiento del apartado 6.2.1, utilizando la muestra de leche calentada (6.1.2) y la muestra tratada con penicilinas (6.1.3). En lugar de añadir penicilinas a 10 ml de la muestra de leche, puede empaparse en esta muestra un disco preparado con penicilinas (5.3.2) y colocarlo en la placa de prueba.
- 6.3.2. Realizar de nuevo el procedimiento descrito en el apartado 6.2.1 con cada una de las soluciones patrón de penicilina citadas en las letras a) a d) del apartado 5.2.
- 6.3.3. Determinar los diámetros medios de las zonas claras de inhibición de la muestra de leche, del control de penicilinas y de las soluciones patrón de penicilina.
7. *Interpretación de los resultados (véase el punto 2).*
- 7.1. Si alrededor del disco de control de penicilinas no existe una zona clara, pero sí la hay alrededor del disco de la muestra de leche y es igual o mayor que la zona alrededor del disco de la solución patrón de penicilina [5.2.a)], la sustancia inhibitora en la muestra de leche corresponde a una concentración de benzilpenicilina sódica o potásica de al menos 0,004 µg/ml.
- 7.2. Si el diámetro medio de la zona clara alrededor del disco que contiene penicilinas es igual al de la zona clara alrededor del disco que contiene la muestra de leche, la leche contiene sustancias inhibitoras que no pueden inactivarse con las concentraciones de penicilinas que se utilizan en el presente procedimiento.
- 7.3. Si el diámetro medio de la zona clara alrededor del disco que contiene penicilinas es menor que el de la zona clara alrededor del disco que contiene la muestra de leche, calentada de conformidad con el apartado 6.1.2, la muestra de leche contiene penicilina y otros antibióticos, incluidas las sulfamidas, distintos de la penicilina o la penicilina semisintética, que no pueden identificarse mediante la concentración de penicilinas utilizada en el presente procedimiento. Las penicilinas sintéticas, como la cloxacilina sódica, pueden no inactivarse mediante la penicilinas en las condiciones del análisis y, por lo tanto, pueden considerarse como inhibidores distintos de la penicilina.
- Nota:*
- Si es necesario, pueden identificarse las sustancias inhibitoras distintas de la penicilina por medio de los procedimientos apropiados.
8. *Determinación del contenido en penicilina*
- 8.1. La determinación del contenido en penicilina puede efectuarse mediante el trazado de una curva patrón o mediante el cálculo de los tamaños de zonas obtenidos con las soluciones patrón de penicilina en leche letras a) a d) del apartado 5.2.

8.2. Trazado de una curva patrón

Dado que existe una correlación lineal entre el log 10 de la concentración de penicilina y el diámetro de las zonas inhibitoras, es posible trazar la curva patrón en papel semilogarítmico, correspondiendo las concentraciones de penicilina a la ordenada logarítmica y las zonas inhibitoras a la abscisa. Las zonas inhibitoras se calculan como la media de los análisis duplicados. Los diámetros de las zonas inhibitoras se señalan en función de las concentraciones de la penicilina patrón y se traza la curva patrón.

8.3. Cálculo

Las concentraciones de penicilina en la muestra de leche pueden calcularse a partir de los diámetros de zonas utilizando la ecuación o la curva patrón. Para obtener un ensayo exacto, el radio de las zonas de inhibición debe ser, como mínimo, el doble del radio de los discos, como máximo, su quintuplo.

9. Expresión de los resultados

9.1. Los resultados se expresan como contenido en penicilina igual o mayor de 0,004 µg/ml (o indicando la concentración que se haya determinado) o como contenido de sustancias inhibitoras distintas de la penicilina.

9.2. Repetibilidad (r) y reproducibilidad (R)

No se dispone de cifras, que en todo caso no son significativas ya que se incluye un patrón de comparación.

IX. DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS**1. Objeto y ámbito de aplicación**

De acuerdo con lo exigido en el apartado 2 del capítulo VII del Anexo A de la Directiva 85/397/CEE, el presente procedimiento especifica las instrucciones que deberán seguirse para la detección de microorganismos patógenos en la leche pasteurizada.

2. Definición

Se examinarán las especies de bacterias que originan habitualmente las enfermedades de origen alimentario.

La pasteurización es un tratamiento que protege frente a la presencia en la leche de organismos patógenos no resistentes al calor. Si se cumplen las normas establecidas en el apartado 2 del capítulo VII del Anexo A de dicha Directiva en lo que respecta al recuento de colonias a 30°C y 21°C, fosfatasas y coliformes, sólo será necesario un análisis específico para la detección de microorganismos patógenos si se sospecha que la leche puede estar relacionada con brotes de intoxicación alimentaria.

3. Procedimiento

Las autoridades nacionales establecerán los métodos de análisis y la frecuencia con que se realizarán estos, de forma tal que puedan expedirse certificados sanitarios para la leche tratada térmicamente destinada al comercio intracomunitario. Para la detección de los microorganismos patógenos, serán válidos los criterios y métodos aceptados internacionalmente, si estuvieran disponibles.

4. Informe de los resultados

Los resultados de la investigación realizada con respecto a cada uno de los microorganismos patógenos se expresarán del modo siguiente:

Número por mililitro de leche, o bien «presencia» o «ausencia» en el volumen de leche pasteurizada exigido por el método que se utilice. En el informe se describirá con claridad el procedimiento empleado.
