

NORMAS TÉCNICAS REDBLH-BR

PARA BANCOS DE LECHE HUMANA:

Control Sanitario de Leche humana Ordeñada

BLH-IFF/NT- 40.05 – Test Simplificado para Detección de Coliformes Totales

FEB 2005 BLH-IFF/NT- 40.05

Test Simplificado para Detección de Coliformes Totales

Red Nacional de Bancos de Leche Humana

FIOCRUZ/IFF-BLH

Av. Rui Barbosa, 716 – Flamengo

Rio de Janeiro CEP 20550-020

Tel/fax: (5521) 2553-9662

www.redeblh.fiocruz.br

Origen

Centro de Referencia Nacional para Bancos de Leche humana – Instituto Fernandes Figueira / Fundación Oswaldo Cruz / Ministerio de Salud

Autores

João Aprígio Guerra de Almeida; Vander Guimarães & Franz Reis Novak

Palabras Llave: Bacterias. Banco de leche humana. Coliforme. Calidad. 5 páginas

SUMARIO

1. Objetivo
2. Documentos Complementarios
3. Equipamientos
4. Fundamentos
5. Ejecución del Ensayo
6. Resultados

ANEXO – Formulario para Registro Diario de No conformidades

1. Objetivo

Esta Norma prescribe el método para determinación de bacterias coliformes totales en la leche humana ordeñada pasteurizada, con el objetivo de garantizar la calidad, bajo el punto de vista microbiológico, del alimento distribuido por los Bancos de Leche humana.

2. Documentos Complementarios

En la elaboración de esta Norma fueron consultados:

MB-3463:1991. Bacterias coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* en alimentos – Determinación del número mas probable

Novak, F. R. & Almeida, J. A. G., 2002. Test alternativo para la detección de coliformes en leche humana. *Jornal de Pediatría*, 78:587-591.

Portaría MS-322/88. Normas para Implementación y Funcionamiento de Bancos de Leche humana. DOU – 26/05/1988

Programa Nacional de Calidad en Bancos de Leche humana – Manual del Participante. Fundación Oswaldo Cruz – Instituto Fernandes Figueira – Rio de Janeiro. 2002

3. Fundamentos

3.1 Cuadro Teórico

El referencial teórico que verifica la sustentación técnico-científica a los fundamentos que componen esta Norma fue extraído de las siguientes fuentes:

ALMEIDA, J. A. G., 1986. *Qualidade do Leite humano Coletado e Processado em Bancos de Leite*. Disertación de Maestría, Viçosa, Facultad de Ingeniería de Alimentos, Universidad Federal de Viçosa.

ALMEIDA, J. A. G., 1992. *Fatores de Defesa do Leite humano: Ecologia microbiana* (película video). 1 casete VHS, 34 minutos, color., sonoro. Rio de Janeiro: Núcleo de Video – CICT/Fundación Oswaldo Cruz.

ALMEIDA, J. A. G., 1992. *O Leite humano: aspectos relativos à composição* (película video). 1 casete VHS, 34 minutos, color., sonoro. Rio de Janeiro: Núcleo de Vídeo – CICT/Fundación Oswaldo Cruz.

NOVAK, F. R. & ALMEIDA, J. A. G., 2002. Teste alternativo para a detecção de coliformes em leite humano. *Jornal de Pediatría*, 78:587-591.

3.2 Principio

El control de calidad microbiológico de la leche humana ordeñada practicado por la Red Nacional de Bancos de Leche humana en Brasil, sigue la lógica preconizada para alimentos, que instituye la utilización de microorganismos indicadores de calidad sanitaria. En este contexto, el grupo coliforme ha ocupado un lugar destacado, por ser de cultivo simple, económicamente viable y seguro, minimizando la posibilidad de resultados falso-positivos.

A partir del procedimiento clásico para detección de coliformes totales, fue desarrollada una metodología alternativa que consiste en el inóculo de cuatro alícuotas de 1ml cada una, extrayendo con pipeta de forma independiente, en tubos con 10 ml de Caldo Verde Brillante (BGBL) a 5% p/v, con tubos de Durham en su interior. Tras la inoculación e incubación a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, la presencia de gas en el interior del tubo de Durham caracteriza resultado positivo. El tubo positivo, por su vez, debe ser repicado, con auxilio de ansa bacteriológica, para tubos conteniendo BGBL en la concentración de 40g/L. Tras la incubación de estos tubos por igual período, la presencia de gas confirma la existencia de microorganismos del grupo coliforme, tornando el producto impropio para consumo.

La metodología alternativa y la clásica no difieren entre sí, cuando comparadas por el test de Xi Cuadrado, al nivel de 5% de probabilidad.

4. Equipamientos

El equipamiento necesario para la ejecución del ensayo deberá constar de:

- a. pipetas serológicas graduadas de 1ml de capacidad, con algodón en los bocales y esterilizadas;
- b. tubos de Durham;
- c. tubos indicados para cultivo microbiológico con capacidad mínima de 15ml;
- d. autoclave que permita operar a 121°C por 15 minutos;

- e. estufa bacteriológica para cultivo, regulada de 35 a 37°C con exactitud de ± 1°C;
- f. balanza semianalítica con sensibilidad de 0,1g;
- g. ansa bacteriológica de 0,01ml;
- h. Mechero de Bunsen;
- i. Vaso de precipitación para preparación de medio de cultivo;
- j. tubo de ensayo;
- k. frasco de Erlenmeyer
- l. estante para soporte, revestido en PVC
- m. hielo o hielo reciclable
- n. cajas isotérmicas revestidas en PVC

5. Ejecución del Ensayo

5.1 Materiales y reactivos

Caldo Verde Bile Brillante 2% Lactosa

Agua destilada o desionizada

5.2 Procedimiento

5.2.1 Preparación de los medios de cultivo y reactivos

5.2.1.1 Preparación del Caldo Verde Bile Brillante – Concentrado (5% p/v)

Pesar 50g del medio de cultivo descripto en materiales y reactivos, y adicionar a 1 litro de agua destilada o desionizada.

Agitar hasta disolución completa.

Distribuir 10ml del medio de cultivo ya preparado en tubos indicados para cultivo microbiológico con capacidad mínima de 15ml y colocar los tubos de Durham invertidos en el interior, juntamente con el medio de cultivo.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, en autoclave.

Después del enfriamiento identificar los lotes de tubos con nombre del medio, concentración y plazo de validez.

Los tubos con medio de cultivo podrán ser mantenidos bajo refrigeración a 5°C, conforme capítulo “Cadena de Frío”, por hasta 15 días.

Certificarse inmediatamente antes de cada utilización que los tubos de Durham estén completamente inmersos en el medio de cultivo y libres de burbujas de aire en su interior.

5.2.1.2 Preparación del Caldo Verde Bile Brillante – Simple (4% p/v)

Pesar 40g del medio de cultivo descripto en 4.1 y adicionar a 1 litro de agua destilada o desionizada.

Agitar hasta disolución completa.

A seguir, distribuir 9ml del medio de cultivo en tubos indicados para cultivo microbiológico con capacidad mínima de 15ml y adicionar los tubos de Durham invertidos.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, en autoclave.

Después del enfriamiento identificar los lotes de tubos con nombre del medio, concentración y plazo de validez.

Los tubos con medio de cultivo podrán ser mantenidos bajo refrigeración a 5°C, conforme capítulo “Cadena de Frío”, por hasta 15 días.

Certificarse inmediatamente antes de cada utilización que los tubos de Durham estén completamente inmersos en el medio de cultivo y libres de burbujas de aire en su interior.

5.2.2 Validación de la esterilización del medio de cultivo

Tras la esterilización, los tubos conteniendo medio de cultivo deberán ser sometidos a test de validación. Para tanto, 10% de cada lote esterilizado debe ser incubado a temperatura de 37°C por 24horas. La formación de gas o turbiedad del medio en un único tubo descalifica el lote producido.

5.2.3 Recolección de material para análisis

Tras el tratamiento térmico (pasteurización), extraer 4 alícuotas de 1ml de la muestra a ser analizada. Las alícuotas deberán ser recogidas en puntos diferentes del frasco.

Sembrar todas las alícuotas de una misma muestra en un único tubo de cultivo conteniendo Caldo Verde Bile Brillante concentrado. El procedimiento deberá ser

conducido con rigor microbiológico, utilizando ambiente estéril, o campo de llama durante todo el procedimiento.

Tapar los tubos conteniendo la leche con el medio de cultivo e incubarlos a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas, en estufa.

5.2.4 Cuidados con la muestra

Cada tubo que reciba la muestra debe contener el número del frasco del cual la leche fue extraída.

El acondicionamiento y el transporte de las muestras con el producto para análisis deberán ser en cajas isotérmicas manteniendo las mismas condiciones de Cadena de Frío preconizadas para la LHO

5.2.5 Determinación de coliformes totales

La determinación de la presencia o ausencia de los coliformes totales se da por la observancia de la formación de gas en el interior de los tubos de Durham.

Son considerados positivos para coliformes aquellos tubos que contengan en su interior tubos de Durham con formación de burbuja (gas), en el período de 24 a 48 horas de incubación.

La presencia de gas indica un resultado presuntivo, que deberá ser sometido a prueba confirmatoria, obligatoriamente.

5.2.6 Prueba confirmatoria

La prueba confirmatoria para presencia de coliformes se hace utilizando los tubos con resultados considerados positivos.

Recoger, bajo campo de llama, con auxilio del ansa bacteriológica, una muestra de aquel tubo con presencia de gas e inocular en medio Caldo Verde Bile Brillante en la concentración de 4% p/v.

Incubar el tubo con el medio Caldo Verde Bile Brillante en la concentración de 4% p/v y la muestra en estufa a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 48 horas.

6. Resultados

6.1 Interpretación

Se considera como resultado positivo final, aquellos frascos en que ocurrió la formación de gas en el test confirmatorio.

6.2 Valores aceptables

Una vez que el objetivo de la pasteurización es eliminar 100% de las bacterias patógenas, la presencia de coliforme en una muestra de leche pasteurizada caracteriza el producto como impropio para consumo.

Los resultados serán expresados como ausencia y presencia de coliformes totales.

BLH-IFF/NT- 40.04 ANEXO

FORMULÁRIO PARA REGISTRO DIÁRIO DE RESULTADOS

INVESTIGACIÓN DE COLIFORMES TOTALES

Resumen Mensual

Mes: _____ **Año:** _____

Muestras Analizadas	Presencia		Ausencia	
	N	%	N	%