

**NORMA
VENEZOLANA**

**COVENIN
769-79**

**LECHE.
RECUENTO MICROSCOPICO
DIRECTO**



T R A M I T E

COMITE: CT10 ALIMENTOS.

PRESIDENTE: Dr. Alvaro Llopis

SECRETARIO: Ing. Milagros Díaz

SUBCOMITE 4: LECHE Y PRODUCTOS DERIVADOS.

COORDINADORES: Ing. Milagros Díaz .

Lic. Omaira Guaita.

PARTICIPANTES

ENTIDAD

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE VETERINARIA

INDUSTRIAS LACTEAS VENEZOLANA C.A
(INDULAC)

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA

PRO - AGRO C.A

ALIMENTOS KRAFT DE VENEZUELA

HELADOS TIO - RICO S.A

ASOCIACION DE INDUSTRIALES DE
LECHE EN POLVO (ASOLEP)

UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR

CAMARA VENEZOLANA DE LA INDUSTRIA
DE ALIMENTOS (SAVIDEA)

C.A VENEZOLANA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMIA

REPRESENTANTES

Luis E. Dávila

Carmen Yolanda Lara
Gladys Mendez

Cecilia de Rojas

Reinaldo Lagonelli

Aníbal Zubillaga
Santiago Tribaldos

Wanda Gantier

Luis Lameda

Claudio González

Luis Boscán

Manuel Cols Páez
Ingrid Esaá

José Félix Chévez

José Cegarra

MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA
SOCIAL (M.S.A.S)

Rafael Albornoz
José Román

ESPECIALIDADES ALIMENTICIAS C.A. (ESPALSA)

María del Carmen Martín

DISCUSION PUBLICA :

Fecha de envío : 28-07-78

Duración: 60 días

FECHA DE APROBACION POR EL COMITE: 25-07-79

FECHA DE APROBACION POR COVENIN: 30-10-79

2 NORMAS COVENIN A CONSULTAR

COVENIN 228-78 Lacte y sus derivados. Métodos para la toma de
muestras de leche y productos lácteos.

3 RESUMEN DEL ENSAYO

El método se basa en que el número total de microorganismos viables
determinados por técnica microscópica directa (RMD) de leche por
partes a partir de un determinado volumen de muestra, distribuido
uniformemente en un área conocida, desgranados con un sistema de
grado y colorados con un colorante a base de azul de metileno, por
lo que observados al microscopio y reconocidos las bacterias, que
luego son contadas (leucocitos) presentes en la muestra.

4 EQUIPO DE ENSAYO

NORMA VENEZOLANA

COVENIN

LECHE

769-79

RECUESTO MICROSCOPICO

DIRECTO

1.- ALCANCE

Esta norma contempla el método de ensayo para estimar rápidamente el grado de contaminación bacteriana en leche fluídas y confirmación de leches mastíticas.

2 NORMAS COVENIN A CONSULTAR

COVENIN 938-76 Leche y sus derivados. Métodos para la toma de muestras de leche y productos lácteos.

3 RESUMEN DEL ENSAYO

El método se basa en que el número total de microorganismos puede determinarse por recuento microscópico directo (RMD) de frotis preparados a partir de un determinado volumen de muestra, distribuidos uniformemente en un área conocida, desgrasados con un solvente apropiado y coloreados con un colorante a base de azul de metileno, para luego observarlos al microscopio y reconocer las bacterias y células somáticas (leucocitos) presentes en la muestra.

4 EQUIPO DE ENSAYO

4.1 APARATOS

4.1.1 Láminas portaobjeto. para frotis de leche

4.1.1.1 Las láminas pueden ser de los siguientes tamaños:

25,4 x 76,2 mm (1 x 3 pulgadas)

50,8 x 76,2 mm (2 x 3 pulgadas)

50,8 x 114,3 mm (2 x 4,5 pulgadas)

4.1.1.2 Deben tener áreas delimitadas de 1cm^2 (11,29 mm de diámetro aproximadamente, cuando sean circulares) (Ver Fig. 1)

4.1.1.3 Las láminas ya usadas, pueden lavarse para ser utilizadas nuevamente. El lavado se hará de la manera siguiente:

- a) Se sumergen las láminas en solución detergente alcalina y caliente, hasta que se encuentren libres de residuos
- b) Se enjuagan cuidadosamente durante 10 a 15 seg con agua corriente, y luego con agua destilada.
- c) Se secan y se guardan apropiadamente para mantenerlas lo mas limpias posible.
- d) Debe procurarse, que durante la manipulación de las láminas, no queden huellas digitales en su superficie.
- e) Después del lavado, si se quiere las láminas pueden guardarse en alcohol al 95%, y flamearse antes de usarlas.
- f) Las láminas flameadas y secas según el punto (e), deben usarse inmediatamente.

4.1.1.4 Las láminas nuevas se sumergen en una solución limpiadora (Ej. mezcla sulfocrómica), se lavan cuidadosamente por 10 a 15 seg en agua corriente y se enjuagan con agua destilada. Finalmente se secan como en el caso 4.1.1.3.

4.1.2 Micropipetas calibradas para descargar 0,01 ml de leche (ver Fig. 2). Mientras no estén en uso, las pipetas deben mantenerse sumergidas en una solución detergente no jabonosa o una solución limpiadora fuerte.

Antes de usarlas, se enjuagan cuidadosamente con agua limpia hasta que estén libres de detergente o solución limpiadora.

4.1.3 Filamento de platino ligeramente doblado para extender 0,01 ml de leche sobre el área delimitada en la lámina.

4.1.4 Equipo de secado, el cual debe cumplir lo siguiente:

- a) Superficie nivelada y limpia, protegida del polvo.
- b) Fuente de calor regulable de 40 - 45°C

4.1.5 Pinzas, para sumergir las láminas

4.1.6 Portaláminas preferentemente de vidrio o de acero inoxidable.

4.1.7 Cubetas o jarras con tapa para coloración

4.1.8 Caja portaláminas.

4.1.9 Microscopio compuesto, preferiblemente binocular con un objetivo de inmersión de 1,8 mm (aumento de 100 x) y un ocular de 10 x que permita obtener un factor entre 300.000 a 600.000, y que tenga lámpara acoplada.

4.1.10 Disco ocular subdividido en cuadrantes

Antes de usarlo, se determina el factor del microscopio correspon

diente al área a examinar.

4.1.11 Portaobjeto graduado en divisiones de 0,1 y 0,01 mm. (micrométrico)

4.1.12 Contador manual

4.1.13 Papel absorbente

4.1.14 Papel de filtro capaz de retener precipitados finos

4.1.15 Frasco de 200 ml

4.1.16 Cedazo fino o tamiz

4.2 REACTIVOS

Los reactivos químicos usados deben ser de la mas alta pureza, a menos que se especifique otra cosa. Los recipientes que contienen reactivos patrón deben mantenerse muy bien cerrados. Debe evitarse el uso de reactivos líquidos que contengan materias extrañas en suspensión.

4.2.1 Alcohol etílico al 95%

4.2.2 Tetracloroetano de grado técnico (Ver Nota 1)

4.2.3 Acido acético glacial

NOTA 1 Este reactivo es muy tóxico y corrosivo; por lo cual debe manipularse con todas las precauciones necesarias.

- 4.2.4 Cloruro de azul de metileno certificado
- 4.2.5 Solución colorante de Newman Lampert modificado por Levowitz-Weber, la cual se prepara bajo una campana de extracción de la manera siguiente:
- 4.2.5.1 Se pasa el cloruro de azul de metileno seco a través de un cedazo fino o tamiz a fin de eliminar terrones.
- 4.2.5.2 Se pesan 0,6 gr de cloruro de azul de metileno tamizado y se coloca en un frasco de 200 ml.:
- 4.2.5.3 Se agregan lentamente 52 ml de alcohol etílico al 95% y 44 ml de tetracloroetano y se agita hasta disolver.
- 4.2.5.4 Se deja esta solución en reposo toda la noche bajo refrigeración a una temperatura de 4 a 7°C
- 4.2.5.5 Se filtra esta solución a través de un papel de filtro que retenga precipitados finos.
- 4.2.5.6 Se le agregan 4ml de ácido acético glacial y se conserva en una botella ámbar, limpia, cuya tapa no sea atacada por los reactivos del colorante.
- 4.2.5.7 La botella debe mantenerse muy bien cerrada para evitar la evaporación de los solventes y la formación de precipitados que contaminen posteriormente los frotis que van a colorearse.
- 4.2.5.8 Se guardan las botellas en un lugar fresco relativamente oscuro.

4.2.6 Aceite de inmersión con un índice de refracción de 1,51-1,52 a 20°C, del tipo no secante, preferiblemente de viscosidad media.

4.2.7 Xileno o cualquier otro solvente de grasas.

5.- MATERIAL A ENSAYAR

El material a ensayar consiste en una muestra de leche fluida tomada según la Norma COVENIN 938.

6.- CONDICIONES DE ENSAYO

6.1 El diámetro del campo microscópico debe ser tal que se obtengan factores microscópicos de 300.000 a 600.000 (Ver 7.1)

6.2 Los instrumentos de transferencia y material de vidrio deben mantenerse escrupulosamente limpios y libres de partículas extrañas, mediante el uso de una técnica adecuada.

6.3 Para evitar el crecimiento bacteriano durante la preparación de los frotis debe trabajarse rápida pero cuidadosamente.

6.4 Cuando la solución colorante en uso esté contaminada o alterada debe descartarse.

6.5 La cubeta de coloración, debe taparse a fin de evitar que ocurra evaporación de la solución colorante. El uso repetido de solución colorante en cubetas destapadas, puede provocar precipitación del colorante debido a la evaporación del solvente.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 DETERMINACION DEL FACTOR DEL MICROSCOPIO (FM)

7.1.1 Se coloca el portaobjeto micrométrico (4.1.11) sobre la platina del microscopio, y se enfoca la escala utilizando el ocular 10 x y el objetivo de inmersión.

7.1.2 Se mide el diámetro del campo en milímetros y se divide por 2 para obtener el radio.

7.1.3 Se calcula el factor del microscopio, aplicando la siguiente fórmula:

$$FM = \frac{10,000}{3,1416 \times r^2}$$

donde:

r = radio del campo en milímetros.

7.1.4 Para obtener mayor simplificación en el trabajo de rutina, se puede contar siempre el mismo número de campos, en cuyo caso basta multiplicar el número total de bacterias observado, por un factor de trabajo (FT) que se obtiene dividiendo el factor del microscopio (FM) entre el número constante de campos contados.

$$FT = \frac{FM}{\text{Número de campos contados}}$$

7.2 PREPARACION DEL FROTIS

7.2.1 Se agita la muestra 25 veces y con una micropipeta se miden 0,01 ml (libre de espuma), se limpia la parte externa con papel absorbente y se transfiere el volumen al área delineada (1cm²) de la lámina portaobjeto (4.1.1), distribuyendo uniformemente el líquido con el filamento de platino de punta doblada (4.1.3)

7.2.1.1 Para prueba de rutina se puede emplear un asa de platino calibrada para transferir 0,01 ml de muestra.

7.2.2 La(s) película(s) de la(s) muestra(s) se deseca(n) sobre una superficie nivelada, mantenida a 40 - 45°C durante 5 min protegiéndola contra el polvo e insectos (ej. en la estufa)

7.3 COLORACION DEL FROTIS

7.3.1 Se desgrasa el frotis, por inmersión en tetracloroetano durante 2 minutos (9.2)

7.3.2 Se tiñe el frotis sumergiéndolo en la solución colorante de Levowitz-Weber (4.2.5) durante 1 min; luego se seca al aire o en la estufa a 40°C.

7.3.3 Se elimina el exceso de colorante mediante inmersión en tres baños sucesivos de agua destilada 40°C.

7.3.4 Se deja secar al aire a una temperatura no mayor de 40-45°C

7.4 EXAMEN MICROSCOPICO

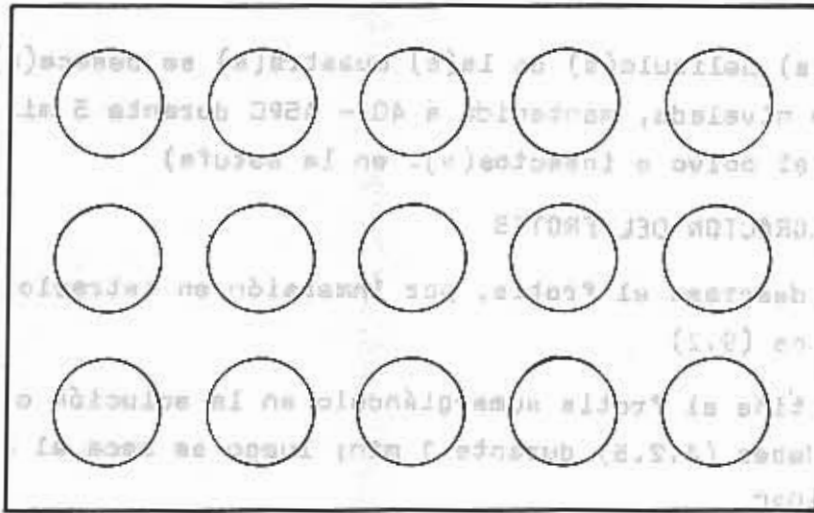
7.4.1 Se monta la preparación al microscopio, se coloca una gota de aceite de inmersión y se observa con el objetivo correspondiente, teniendo el cuidado de suministrar una buena iluminación.

7.4.2 Se cuentan las bacterias presentes en no menos de 30 campos diferentes (ver cuadro 1) ubicados sobre dos bandas separadas 2mm (15 campos en cada banda)

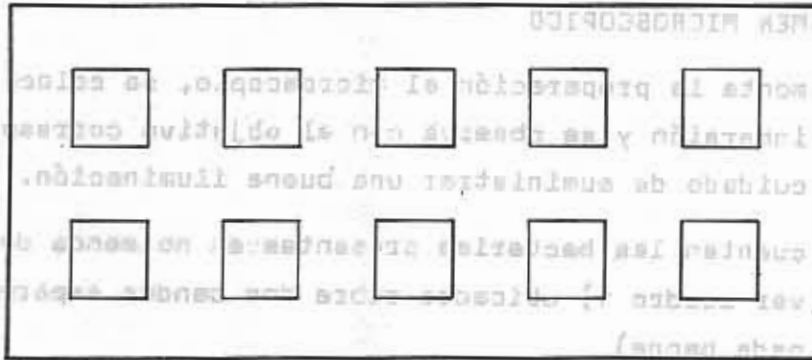
Si se quiere contar un número mayor de campos, se sigue la misma norma hasta completar el número deseado.

7.4.3 Se cuenta como gramo separado cualquier célula o grupo de células (aparentemente del mismo tipo). Se toma como un estimado de la separación de un grupo de células una distancia aproximada al doble del diámetro de las mas pequeñas; si existen diferentes tipos no se toma en cuenta esta distancia y se cuenta cada tipo como una unidad separada. Las formas diplococales se cuentan como grupos simples.

1) CON AREA CIRCULAR DE 1 cm²



2) CON AREA CUADRADA DE 1 cm²



3) LAMINAS SENCILLAS

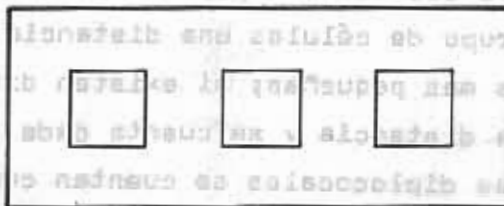


FIGURA I
LAMINAS PORTAOBJETO

8. EXPRESION DE RESULTADOS

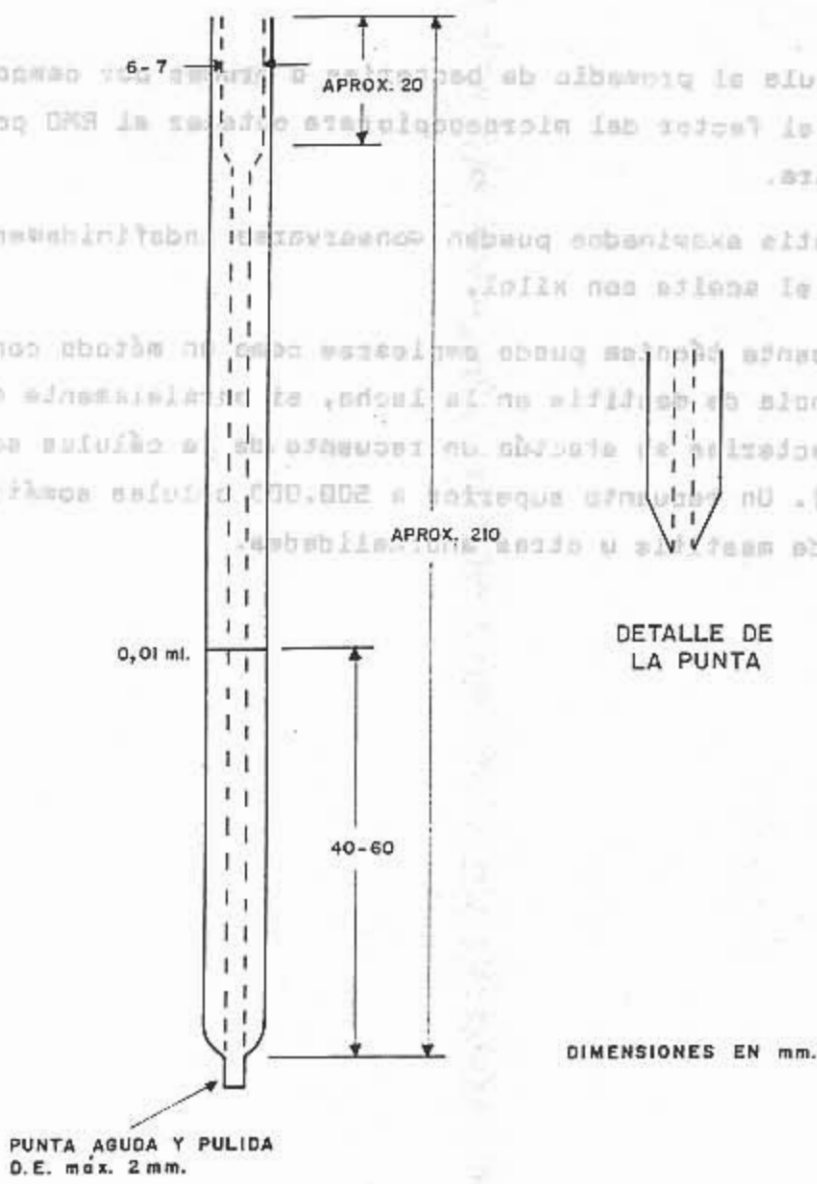


FIGURA 2
PIPETA CALIBRADA PARA DESCARGAR
0,01 ml. DE LECHE A 20°C

8. EXPRESION DE RESULTADOS

8.1 Se calcula el promedio de bacterias o grumos por campo y se multiplica por el factor del microscopio para obtener el RMD por mililitro de muestra.

8.2 Los frotis examinados pueden conservarse indefinidamente después de eliminar el aceite con xilol.

8.3 La presente técnica puede emplearse como un método confirmativo de la presencia de mastitis en la leche, si paralelamente al recuento de las bacterias se efectúa un recuento de la células somáticas (leucocitos). Un recuento superior a 500.000 células somáticas/ml es indicativo de mastitis u otras anomalías.



FIGURA 2
PIPETA CALIBRADA PARA DESCARGAR
0,01 ml DE LECHE A 20°C

CUADRO 1

FACTORES MICROSCOPICOS SUGERIDOS CON SUS CORRESPONDIENTES: (1) DIAMETROS DE CAMPO; (2) NUMEROS DE CAMPOS A EXAMINARSE Y (3) FACTORES DE TRABAJO (FT) CALCULADOS, CUANDO SE HACE EL RECUENTO MICROSCOPICO DIRECTO (GRUMOS). Recuentos por mililitro.

Valores condicionales, FM	300.000	400.000	500.000	600.000
(1) Diámetros de campo, mm	0,206	0,178	0,160	0,146
Límites, del Recuento por ml. 30.000 - 300.000				
(2) Nº de campos	30	40	50	60
(3) FT	10.000	10.000	10.000	10.000
300.000 - 3.000.000				
(2) Nº de campos	20	20	20	30
(3) FT	15.000	20.000	25.000	20.000
Más de 3.000.000				
(2) Nº de campos	10	10	10	20
(3) FT	30.000	40.000	50.000	30.000

A. A P E N D I C E

CUADRO 1

Referencias

- A.1 APHA 1972, "Standard Methods for the Examination of Dairy Products".
13 th edition. American Public Health Association. Washington D.C
- A.2 BOSCAN L.A (1.976). "Manual de prácticas de Laboratorio de Industrias
Lacteas" Sección 12 Universidad Simón Bolívar - Caracas

COVENIN
769-79

CATEGORIA
C

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES
MINISTERIO DE FOMENTO

Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12
Telf. 575. 41. 11 Fax: 574. 13. 12
CARACAS

publicación de:



CDU 637.1276

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS
Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.
