

181
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"MANUAL DE PRACTICAS DE LABORATORIO PARA LA INSPECCION SANITARIA DE LA CARNE"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MARCO ANTONIO RAMIREZ NEGRETE

ASESOR: M. V. Z. GUSTAVO ABASCAL TORRES

MEXICO, D. F.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
TECNICAS FISICOQUIMICAS	7
TECNICAS PARASITOLOGICAS	19
TECNICA INMUNOLOGICA	22
TECNICAS MICROBIOLOGICAS	25
LITERATURA CITADA	38

RESUMEN

Ramírez Negrete Marco Antonio. Manual de Prácticas de Laboratorio para la Inspección Sanitaria de la Carne (bajo la dirección de: MVZ. Gustavo Abascal Torres).

En este manual se presentan las técnicas de laboratorio Físico químicas, Parasitológicas, Inmunológicas y Microbiológicas más importantes en la inspección sanitaria de la carne que se expende a granel.

INTRODUCCION

Fueron desde luego los sacerdotes de muchas civilizaciones los que iniciaran el trabajo de inspeccionar las carnes dedicadas al consumo humano.

En el libro Hindú, las leyes de Manú, se citan repetidas veces la carne como alimento, así como se dan normas para su consumo. Galeno en La Naturaleza de los Alimentos, se refiere someramente a los riesgos de ingerir carne, ya que se creía que la carne de vaca producía Tumores, Lepra y Melancolia.

Los Hebreos resumen en la biblia cuanto sabían sobre higiene de los alimentos, Los libros Levítico y Deuteronomio contienen versículos relacionados con la carne que se debía y no se debía comer, así en el Levítico se puede leer "Y la carne que tocase alguna cosa inmunda no se comerá y será quemada al fuego" (14).

La carne es uno de los alimentos fundamentales en la alimentación humana. Las proteínas que contiene son de primera calidad para la nutrición, pero tiene la particularidad de que con mucha facilidad se contamina, se descompone y puede ser peligrosa para la alimentación de aquí la importancia de la higiene que se tiene que observar en la preparación de la carne, desde su origen en el campo hasta su consumo. La higiene de la carne es muy amplia y se debe tener especial cuidado en todas las etapas de su producción (3).

Los factores que afectan la carne pueden ser de naturaleza física, química o microbiológica y parasitológica y estar presentes en el animal vivo, contaminación "INTRA-Vitam", o bien puede afectar la carne una vez que los animales han sido sacrificados y constituir una, contaminación "Extra-Vitam". Es

importante señalar que puede existir contaminación de ambos tipos en una misma carne. Aún cuando la contaminación Intra y Extra-Vitam son igualmente importantes, esta última es más frecuente (6).

La carne se halla expuesta a la contaminación microbiana, - desde el momento en que se desangra al animal hasta que es consumido. De hecho durante la faena existen numerosas fuentes potenciales de contaminación, tales como: Tejidos infectados, la piel de los animales, el contenido gastrointestinal, el aire, el agua usada para lavar la canal, los utensilios, los diversos recipientes usados y finalmente el personal.

Equipos especiales, molinos, mezcladoras, cortadoras, y embutidoras, diseminan microorganismos perjudiciales en números considerables. También el número de microorganismos aumenta al contacto de la carne con superficies en las que se han desarrollado microorganismos, o con otras carnes (1,8,9,10).

A las personas que producen, transportan, almacenan y preparan alimentos se les llama manejadores de alimentos.

El manejador de alimentos que ha sido entrenado adecuadamente servirá alimentos higiénicos sanos, que serán nutritivos y placenteros para quienes los consuman; pero el trabajador - que nunca ha sido entrenado, preparará y servirá alimentos - contaminados que producirán enfermedad y muerte.

Considerando que en nuestro país, la falta de higiene en la preparación de alimentos es una verdadera tragedia nacional. Es fundamental que las personas que se ocupan de esto, sepan como hacerlo correctamente. Y es la educación la que en un futuro mejorará esta situación (3).

Son muy pocos los rastros de nuestro país que reúnan las

condiciones necesarias para que tengan una función adecuada. Generalmente la carne se maneja en el piso. Los matanceros, el piso, las paredes y todo el local están siempre muy sucios y como consecuencia siempre sale de nuestros rastros carne - contaminada (3).

En la inspección sanitaria veterinaria que se efectua dentro de la carne se reconocen tres niveles de control.

El primero de ellos se refiere a las enfermedades y condiciones físicas que guardan los animales de abasto antes del sacrificio.

El segundo se refiere a los hallazgos postmortem y a las contaminaciones de la carne en canal y víceras.

Finalmente el tercero se iniciara a partir de los cambios bioquímicos necesarios, que ocurren en el músculo para que se convierta en carne, y su preparación para el consumo (14).

En el primer nivel la rutina de inspección se basa en pruebas clínicas y propedeúticas; en el segundo la inspección se basa en pruebas objetivas macroscópicas en la canal, apoyadas por pruebas de laboratorio. Respecto al tercer nivel para determinar si existe alguna contaminación o adulteración y sus productos, se utilizan las pruebas de laboratorio como microbiológicas, parasitológicas, inmunológicas y fisicoquímicas, de las cuales se desprende el objetivo de este trabajo.

La necesidad de pruebas de laboratorio se fundamenta en la dificultad que presenta la carne, en la que no se cuenta con una serie de elementos existentes en la canal, sus fragmentos o las víceras (pulmones, corazón, hígado, bazo, riñones, intestinos, etc.) mismos que denotan muchas veces cambios como inflamaciones, hemorragias, congestiones, etc. que

conlleven a un diagnóstico más o menos seguro.

De tal manera que el esquema de inspección de la carne en este tercer nivel requiere de la integración de técnicas y métodos que auxilien al profesionista inspector a un diagnóstico correcto. De aquí que se proponga un modelo de pruebas - aplicables específicamente a la carne ya cortada que se expende a granel, en la que pudiera pensarse que se ha descuidado el manejo ulterior al rastro por parte de los sistemas de control sanitario ya que después de realizada la inspección en la línea de matanza; en el andén de embarque la carne no se maneja con la higiene requerida, observándose con frecuencia falta de refrigeración, contaminación por deficiente manipulación y transporte, y en otros casos venta de carne cuya especie no es la ofrecida.

En estas situaciones prácticamente las pruebas organolépticas son insuficientes para determinar la calidad sanitaria de la carne, y es cuando el inspector sanitario a nivel de frigoríficos, expendios y transporte deben conocer la utilidad de pruebas que en un momento dado pueden ser utilizadas, mismas que le servirán para complementar y emitir satisfactoriamente un dictamen.

Además del conocimiento para realizar y utilizar las pruebas de laboratorio, se plantea la toma de muestras, manejo y envío de las mismas al laboratorio.

En vista de los cruciales problemas de alimentación mundial que implica la necesidad de procurar suficiente alimento a una población mundial en expansión se puede anticipar la necesidad apremiante de obtener la máxima cantidad de productos

alimentos de origen animal reduciendo en lo posible las pé
didas ocasionadas por microorganismos y otras causas (13).

VOLUMEN DEL EXTRACTO DE LA CARNE (12)**Selección del método:**

La técnica es sencilla, rápida de realizar y permite determinar la cantidad de agua contenida por la carne.

Fundamento:

La carne se desmenuza, se agrega un reactivo extractor, se diluye con agua posteriormente se filtra midiendo el volumen colectado en 15 minutos.

Reactivos:

Fosfato ácido de potasio 0.2 M

Hidróxido de sodio 0.2 M

Reactivo extractor

50 ml de fosfato ácido de potasio 0.2 M + 3.72 ml de hidróxido de sodio 0.2 M con agua destilada cbp 200 ml

Procedimiento:

- 1) A 15 g de carne agregar 60 ml de reactivo extractor y diluir con 200 ml de agua destilada
- 2) Ajustar el pH a 5.8
- 3) Desmenuzar en una licuadora por 2 minutos
- 4) Filtrar a través de papel Whatman No 1 durante 15 minutos
- 5) Medir el volumen de filtrado en 15 minutos desde el momento en que se cae la primera gota

Valor estándar:

≥ 17 ml de filtrado.

BASES VOLATILES TOTALES (12)

Selección del método:

La técnica es sencilla de realizar y nos permite determinar el nitrógeno volátil total mediante un proceso de destilación.

Fundamento:

La carne se desmenuza, se agregan reactivos y se procede a la destilación por 25 minutos para determinar el nitrógeno volátil total.

Reactivos:

- 1) Oxido de magnesio 2 g
 - 2) Alcohol octílico .5 ml
 - 3) Perlas de ebullición 4 perlas
- Todo lo anterior en 450 ml de agua destilada
- 4) Acido bórico al 2% 50 ml
 - 5) Indicador Wislow preparación madre

Rojo de metilo .2%

A .02 ml de rojo de metilo se agrega alcohol al 96 cbp 10 ml.

Azul de metileno

a .02 ml de azul de metileno se agrega alcohol 96% cbp 10 ml

Preparación de trabajo

Por dos partes de rojo de metilo agregar una de azul de metileno. Conservar en frasco ambar.

- 6) Acido clorhídrico 0.1 N
- 7) Acido sulfúrico 0.1 N

Procedimiento:

- 1) Pesar 10 g de carne desmenuzada y adicionar 2 g de oxi-

do de magnesio en un matraz Kjeldahl con 450 ml de agua destilada , 4 perlas de ebullición y alcohol octílico .5 ml.

- 2) En otro matraz Erlenmeyer de 500 ml se ponen 50 ml de ácido bórico al 2% y 3 gotas de indicador de Wislow.
- 3) Conectar el matraz Kjeldahl con el de Erlenmeyer que recibe poniendo el tubo dentro del ácido bórico.
- 4) Destilar 25 minutos.
- 5) Titular el destilado con 0.1 N de ácido sulfúrico o clorhídrico.
- 6) Multiplicar el volumen de titulación por 14 para obtener el total de nitrógeno volátil como mg de N/100 g de muestra.

Valor estándar:

Acceptable no más de 16.5 mg N/100 g de muestra

PRUEBA DE EBULLICION PARA DETECTAR OLORES ANORMALES EN LA CARNE (17)

Selección del método:

Es rápido y sencillo, demuestra las sustancias olorosas - volátiles producidas por la putrefacción de la carne.

Fundamento:

Un trozo de carne se mete a una olla de agua hirviendo en la que posteriormente se determinan el olor de la carne.

Material necesario:

Agua hirviendo y una olla.

Procedimiento:

Un trozo de carne aplanada de 500 g se mete a una olla con agua hirviendo y se tapa inmediatamente hasta la aparición de vapores de agua. Se determina el olor de carne cocida o putrefacta.

Interpretación:

Carne putrefacta: olor putrefacto

Carne normal: olor a carne cocida.

AMONIACO EN CARNE: DETERMINACION CON EL REACTIVO DE NESSLER (17)

Selección del método:

La técnica es sencilla y permite demostrar la presencia de amoníaco en carne putrefacta.

Fundamento:

El amoníaco presente en un lixiviado* de carne reacciona con el reactivo de Nessler y produce un color amarillo.

Reactivos:

1) Cloruro de Mercurio ($HgCl$) al 12%

Cloruro de Mercurio 12 g disuelto en agua destilada
cbp 100 ml

2) Yoduro de potasio (KI) al 14.8%

Yoduro de potasio 14.8 g disuelto en agua destilada
cbp 100 ml

3) Yoduro de potasio 5 g

4) Hidróxido de sodio ($NaOH$) al 30%

Hidróxido de sodio 30 g disuelto en agua destilada cbp
100 ml

A una solución de 50 ml de Cloruro de Mercurio al 12% se le adicionan para precipitarlo 50 ml de Yoduro de potasio al 14.8% el precipitado producido debe lavarse 3 veces con agua.

Al precipitado se le agregan 5 g de Yoduro de potasio y este se disuelve mezclándolo con 65 ml de hidróxido de sodio al 30%, posteriormente se le agrega agua cbp 1000 ml.

Al cabo de 24 horas la solución se vierte en un frasco de color ambar y se guarda en lugar obscuro y frío ($4^{\circ} C$).

* Lixiviado: Parte soluble de la carne obtenida al mezclar es ta con un solvente.

Procedimiento:

- 1) 20 g de carne sin grasa ni fascias se pican y posteriormente se agitan vigorosamente en un Erlenmeyer con 200 ml de agua destilada se deja Lixiviar la mezcla de carne en el agua durante unos 5 a 10 minutos y se pasan a través de un papel filtro recogiendo el extracto en un matraz Erlenmeyer.
- 2) Un ml de lixiviado se vierte en un tubo de ensaye y se le agregan 10 gotas de reactivo de Nessler y se mezclan

Interpretación:

El lixiviado de carne fresca no sufrira ningún cambio de color.

La presencia de amoníaco ocasiona un líquido de color amarillo.

AMONIACO EN CARNE: DETERMINACION CON EL REACTIVO DE EBER (17)**Selección del método:**

La técnica es sencilla, rápida y nos permite demostrar la presencia de amoníaco en la carne.

Fundamento:

La carne con amoníaco colocada a un centímetro de distancia del reactivo de Eber produce un humo color blanco.

Reactivos:

1) Acido clorhídrico de peso específico 1:125

2) Alcohol al 96%

El alcohol se pone en un alcoholímetro y se agrega agua hasta que marque 96% GL

3) Eter etílico

4) Reactivo de Eber

Se mezclan en un frasco de tapa esmerilada 1 volumen de ácido clorhídrico de peso específico 1.125 con 3 volúmenes de alcohol al 96% y 1 volumen de éter etílico.

Procedimiento:

1) Se pipetea sobre la pared de un tubo de ensayo de 2 a 3 ml de reactivo de Eber.

2) A una tapa de goma perforada, se le pasa una varilla de cristal cuya punta tiene forma de gancho en el que se insertan 10 g de carne y con esta se cierra inmediatamente el tubo con el reactivo de Eber. El extremo de la varilla con la carne se acerca a 1 cm de distancia por encima del reactivo.

Interpretación:

Reacción negativa: No se produce humo de amoníaco

Reacción positiva débil: El humo de amoníaco se produce en poca cantidad y desaparece rápidamente.

Reacción positiva moderada: Al cabo de algunos segundos de introducida la varilla en el tubo de ensayo el humo ocupa unos dos tercios del tubo.

Reacción positiva fuerte: Inmediatamente después de introducida la varilla el humo ocupa todo el tubo de ensayo.

PRESENCIA DE ACIDO SULFHIDRICO EN CARNE (17)

Selección del método:

Es una técnica sencilla, rápida que nos permite demostrar la presencia de ácido sulfhídrico.

Fundamento:

El ácido sulfhídrico reacciona con el acetato de plomo y forma una mancha oscura en un papel filtro.

Reactivos:

1) Acetato de plomo (P/V)

10 g de acetato de plomo se disuelve en agua destilada cbp 100 ml

2) Hidróxido de potasio o de sodio al 10 % (P/V)

10 g de hidróxido de potasio o sodio se disuelven en agua destilada cbp 100 ml

3) Acetato alcalino de plomo

A 10 ml de una solución de acetato de plomo al 10% se añade una solución de hidróxido de potasio al 10% gota a gota hasta la formación de precipitado y después hasta disolverlo.

Procedimiento:

- 1) Se colocan 150 g de carne finamente picada en un matraz Erlenmeyer con tapa esmerilada.
- 2) Se introduce una tira de papel filtro humedecido con acetato alcalino de plomo hasta una distancia aproximada de 1 cm por encima del nivel de la carne.
- 3) Se tapa el Erlenmeyer y se mantiene por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Se compara el papel utilizado en la prueba con uno humedecido con acetato alcalino de plomo.

Interpretación:

Reacción negativa: El color del papel de la prueba es simi
lar al papel humedecido con acetato alcalino de plomo

Reacción positiva débil: Coloración parda en los extremos
del papel.

Reacción positiva moderada: Coloración parda oscura en
el borde del papel.

Reacción positiva fuerte: Papel de color negro.

DETERMINACION COLORIMETRICA DEL pH (17)

Selección del método:

Esta técnica es sencilla y rápida aunque no ofrece mucha precisión, pero es suficiente para completar los resultados obtenidos a través del examen organoléptico.

Fundamento:

A un extracto de carne se le agrega una solución de nitrofenol (para o meta) y el color desarrollado se compara con el color de las soluciones estándar.

Reactivos:

1) Preparación de la solución madre de p-nitrofenol:

Solución para-nitrofenol 1%

1 g de p-nitrofenol se disuelve en agua destilada cbp
100 ml

Solución de trabajo

A 0.3 ml de para-nitrofenol al 1% se le agrega agua destilada cbp 100 ml

2) Preparación de la solución madre de meta-nitrofenol

Solución meta-nitrofenol 1%

1 g de m-nitrofenol se disuelve en agua destilada cbp
100 ml

Solución de trabajo

A 0.3 ml de meta-nitrofenol al 1 % se le agrega agua
cbp 100 ml

Procedimiento:

- 1) Veinte gramos de carne sin grasa ni fascias, se pican, y se agitan vigorosamente en un Erlenmeyer con 200 ml de agua destilada se deja lixiviar la mezcla de carne

en el agua durante unos 5 a 10 minutos y se filtra a través de un papel filtro Whatman recogiendo el extracto en un matraz Erlenmeyer.

2) Se pipetea 6 ml de extracto de carne en un tubo de ensayo y se agrega 1 ml del indicador para o meta nitrofenol.

3) A través de las perforaciones translúcidas situadas en el sector inferior del comparador de (Michaelis) se compara el color del líquido a medir con el color estándar

Interpretación:

El pH en carne fresca: 6.2 a 6.5 y puede descender hasta 5.4

Inicio de putrefacción: pH de 6.6

Carne putrefacta: pH de 7

MUESTREO Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA PARA EL ANALISIS PARASITOLÓGICO

Para el diagnóstico de Triquinosis se emplean trozos de músculo fresco sin agentes fijadores.

Se escogen para el diagnóstico los músculos como: diafragma, intercostales maseteros y lengua. Las muestras deben pesar entre 0.5-1.0 gramos.

Las muestras se envían en frascos de vidrio limpios o en bolsas de polietileno selladas e identificadas refrigerando las muestras para evitar su descomposición. (19)

METODO DE TRIQUINOSCOPIA COMPRESION EN PLACA

Selección del método:

Esta técnica es muy rápida y sencilla para diagnosticar Trichinella spiralis en carne.

Fundamento:

La carne se comprime entre dos placas de vidrio y posteriormente se observa al microscopio estereoscópico para observar los quistes (19).

Material necesario:

Muestra de carne de los siguientes músculos. Diafragma, maseteros, intercostales y lengua.

Triquinóscopio.

Procedimiento:

- 1) Se cortan 12 muestras de 0.5-1 g de músculo sin grasa ni tejido conjuntivo.
- 2) Se colocan las muestras entre dos placas de vidrio de 0.75 cm de grosor y aplastan fuertemente.
- 3) Se observan en el microscopio estereoscópico.

Interpretación.

El hallazgo de un quiste de Triquina indica una muestra positiva.

Cada quiste contiene generalmente sólo una larva que al completar su crecimiento, está enrollada en espiral. Los quistes miden de 0.4 a 0.6 mm por 0.25 mm. En carnívoros son redondos generalmente, y ovaes en hombre y cerdo. (11).

METODO DE DIGESTION ARTIFICIAL

Selección del método:

Es una prueba sencilla, rápida y su eficiencia es alta.

Fundamento:

Se digiere músculo por medio de jugo gástrico artificial que libera las larvas de Trichinella spiralis enquistadas las cuales se observan en el microscopio (5)

Reactivos:

- 1) Ac. clorhídrico 36 a 38%
- 2) Pepsina 0.1 g
- 3) Jugo gástrico artificial

Se mezclan 19 ml de ácido clorhídrico al 36.5 a 38% con 0.1 g de pepsina.

Procedimiento:

- 1) De 5 a 10 g de carne se pican finamente y se ponen en una gasa, sobre el embudo del aparato de Baermann.
- 2) Se llena el embudo con jugo gástrico artificial hasta cubrir totalmente las muestras.
- 3) Se coloca el aparato de Baermann en la incubadora a 37°C por 24 horas.
- 4) Se extrae el sedimento del embudo del aparato de Baermann y se centrifuga a 1500 revoluciones por minuto/10 minutos.
- 5) Se pone el sedimento en un vidrio de reloj y se observa al microscopio (20).

Interpretación:

El hallazgo de una sola larva de Triquina indica una muestra positiva (11).

IDENTIFICACION DE LA CARNE POR LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION O PRUEBA DE OUCHTERLONY.

Selección del método:

Está técnica sencilla permite determinar específicamente la especie animal de la que proviene la carne.

Fundamento:

El antígeno y el anticuerpo migran el uno hacia el otro en el gel, formándose unas líneas de precipitación de identidad, identidad parical y no identidad (4, 7).

Reactivos:

- 1) Gel Agar
(hongard oxid)
- 2) Amortiguados de veronal p/v

Acetato de sodio	6.5 g
Barbital sódico	8.87 g
Acido barbitúrico	1.13 g
Agua destilada cbp	1000 ml
- 3) Solución salina al 0.85% p/v

Cloruro de sodio	0.85 g
------------------	--------

 y se agrega agua destilada cbp 100 ml

Preparación del gel de agar. En 70 ml de agua destilada se disuelven 1.0 g de longard Oxoid y se calienta en baño de María

También se disuelven 0.82 g de amortiguados de venonal en 25 ml de agua destilada ligeramente caliente. Ambos preparados se ponen en un matraz volumétrico de 100 ml donde se completa el volumen hasta la marca con agua destilada, esta solución se esteriliza en autoclave a 121°C/15 libras de presión durante 10 minutos, hasta fundir el agar completamente. Se adicionan 4

cristales de fenol como conservador y se reparten 15 ml en tubos de ensaye. Estos tubos se tapan con tapón de hule y se refrigeran entre 4 y 6°C hasta el momento de su utilización (2).

Procedimiento:

- 1) Trozos finos de carne 50 g. se licuan con un volumen - igual de solución salina isotónica, se filtran y se - guarda el filtrado en congelación hasta su utilización.
- 2) Se preparan una placa con porta objetos, limpios y desengrasados y se colocan en una superficie perfectamente plana y nivelada y sobre de ella se derraman con una pipeta 5 a 6 ml de agar fundido. El agar se deja solidificar poniéndolo en refrigeración durante 30 minutos. Se hacen cortes en el gel de 5 mm de diámetro aproximadamente con una separación entre uno y otro de 6 mm. Se hace una horadación central y cuatro alrededor, para - ello se utiliza una plantilla dibujada en un papel mili métrico, donde se sitúan los lugares exactos.

Mediante un tubo capilar se coloca en el fondo de los orificios un poco de agar fundido para sellarlos y evitar que los reactivos se difundan entre el gel y el vidrio del portaobjetos, así como también para facilitar la difusión en el seno del gel.

- 3) La muestra de carne se prueba con sueros inmunes: anticarnero, anticerdo, anticabra, antiperro y anticaballo.
- 4) En el orificio central de la placa se colocan, el suero inmune y en los orificios de alrededor se colocan las muestras de carne. El llenado de las horadaciones se hace utilizando tubos capilares.

- 5) Las placas se incuban durante 48 a 72 horas a 37°C en una caja humedecida con un papel filtro con solución de Merthiolate para evitar la desecación y el desarrollo de contaminación en el gel.

Interpretación:

- a) La fusión de líneas de precipitado indica que los antígenos son idénticos, a esta reacción se llama reacción identidad.
- b) Si las líneas se cruzan entre sí, indica que los dos antígenos no poseen ningún determinante antigénico en común.
- c) Cuando las líneas de precipitado se tocan una a otra sin interceptarse, esto indica que los dos antígenos coinciden en algunos determinantes antigénicos, pero difieren en otros.

MUESTREO Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA PARA EL ANALISIS MICROBIOLOGICO

La técnica de colección de una muestra para su análisis microbiológico establece una serie de precauciones y condiciones que deben ser observadas a fin de obtener resultados significativos en el trabajo.

Las recomendaciones generales para obtener muestras son las siguientes:

- 1) Todo el material que se use (bolsas, frascos, etc.) deberán esterilizarse en horno o en autoclave, según el caso, para esto es necesario envolver el material individualmente con papel resistente para protegerlo de la contaminación.
- 2) Al coleccionar la muestra, se debe evitar su contaminación ambiental con: polvo, tierra, saliva, descargas nasofaríngeas o de cualquier otra naturaleza. El recipiente o bolsa se abrirá, lo suficiente para introducir la muestra, hecho esto volverá a cerrarse y a cubrirse con el papel que la proteja. No es requisito indispensable el empleo de mechero de alcohol durante la maniobra.
- 3) Es esencial que el recipiente y los dispositivos empleados para extraer la muestra se encuentren estériles y limpios.
- 4) Es recomendable identificar claramente el recipiente mediante rótulos o etiquetas (indelebles), antes de colocar en él la muestra, a fin de evitar confusiones.
- 5) En el informe o acta anexa se consignará toda la información pertinente que pudiera afectar la prueba o el

significado del resultado, a fin de que el laboratorio tome en consideración al desarrollar el análisis e interpretar el resultado. Por ejemplo la posibilidad de la presencia de algún conservador en la carne, un olor o color singulares, sus condiciones de conservación: temperatura, protección contra contaminantes, etc.

- 6) Si se trata de carne a granel, o de recipientes o piezas grandes de las que hay que retirar una porción, obtenirla de diferentes partes. Si se estima de interés conveniente obtener muestras independientes que pudieran poner de manifiesto problemas distintos. Por ejemplo: no mezclar en el mismo recipiente porciones que muestran alguna alteración, aún pequeña, con porciones normales.
- 7) Transportar las muestras de carne refrigeradas (2 a 8° C). Utilizar para el efecto hielo o hielo seco.
- 8) Se procurará, que el agua de deshielo no alcance la tapa de la carne o que de alguna manera contamine está. Es recomendable el empleo de bolsas para evitar estos inconvenientes.
- 9) Transportar las muestras lo más rápido posible al laboratorio (15, 18).

CUENTA DE BACTERIAS MESOFILICAS AEROBICAS

Fundamento:

Esta técnica permite contar las unidades formadoras de colonias (UFC) mesofílicas que se desarrollan en un medio de cultivo, después de cierto tiempo y temperatura de incubación.

Reactivos y medios de cultivo:

1) Solución madre amortiguadora de fosfatos p/v

Fosfato ácido de potasio 34 g

Agua destilada cbp 500 ml

Esterilizar 20 minutos a 121°C

Preparación madre de la solución amortiguadora de fosfatos.

Disolver el fosfato en agua destilada y ajustar el pH 7.2 con hidróxido de sodio 1 N; se utilizan aproximadamente 175 ml llevar a un litro de agua destilada esterilizar 20 minutos a 121°C y conservar en refrigeración.

Solución de trabajo: Tomar 1.25 de la solución madre y llevar a un litro de agua destilada y esterilizar 20 minutos/121°C.

2) Agar triptona de levadura*

Procedimiento:

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

2) Preparación de la muestra. Se pesan 10 g de carne obtenida

* Merck. S. A.

nidas de diferentes partes de la muestra auxiliándose de cuchara, cucharilla, abatelenguas, espátula o cuchillo estéril. Se transfieren a un vaso de licuadora estéril y agregar 90 ml de solución diluyente calentado a 20°C. Se licuan durante 1 a 2 minutos hasta obtener una suspensión homogénea. Se puede sustituir el tratamiento con licuadora, haciendo uso de mortero estéril y procediendo de tal manera que se logre una suspensión completa y homogénea de la muestra. Posteriormente hacer diluciones decuples 1:9

- 3) Se transfiere 1 ml de la muestra de cada una de las diluciones a cajas de petri estériles, con la punta de la pipeta al fondo de la caja mientras escurre el líquido.
- 4) Se agregan 12 a 15 ml de (agar tripton) fundido y mantenido a temperatura de 45° a 48°C en baño de agua. Se mezclan el medio con la muestra (6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante) sobre una superficie lisa y horizontal y cuidando que el medio no moje la cubierta de las cajas. Se dejan solidificar y se preparan testigos del medio sin inóculo.
- 5) El tiempo transcurrido desde el momento que la muestra se incorpora al diluyente, hasta que se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no deberá pasar de 20 minutos.
- 6) Se incuban las cajas en posición invertida (las tapas a abajo) durante 72 horas y a 22°C.
- 7) Se cuentan todas las colonias desarrolladas en las pla-

cas incluyendo las colonias puntiformes que se observan con el lente de aumento y de la cuadrícula de un contador.

- 8) Multiplicar la dilución por el número de UFC para obtener el número de colonias por gramo de muestra (15, 16, 18).

Interpretación:

La cuenta de UFC en carne fresca no debe ser $> 2 \times 10^6$ UFC/g
Las cuentas de colonias $> 2 \times 10^6$ /g de carne indican fallas en el almacenamiento o que las muestras de carne han sido manejadas en malas condiciones sanitarias (15, 16).

Aislamiento de Staphylococcus aureus en carne

Fundamento:

Las colonias de staphylococcus aureus que se desarrollan en el medio Baird-Parker son negras, circulares brillantes, convexas, de 2 a 3 mm de diámetro y rodeadas por una zona clara en el fondo del medio opaco.

Reactivos y medios de cultivo:

- Medio de Baird-Parker
- Agar azul de toludina DNA
- Caldo infusión cerebro corazón

1) Solución madre amortiguadora de fosfatos p/v

Fosfato ácido de potasio 34 g

Agua destilada cbp 500 ml

Esterilizar 20 minutos a 121°C

Preparación madre de la solución amortiguadora de fosfatos.

Disolver el fosfato en agua destilada y ajustar el pH 7.2 con hidróxido de sodio 1 N; se utilizan aproximadamente 175 ml llevar a un litro de agua destilada esterilizar 20 minutos a 121°C y conservar en refrigeración.

Solución de trabajo: Tomar 1.25 de la solución madre y llevar a un litro de agua destilada y esterilizar 20 minutos/121°C.

Procedimiento:

- 1) Tomar de varios pedazos de carne de diferentes partes de muestra, alrededor de 250 g. De allí tomar 10 g y homogenizar perfectamente, en un licuadora o mortero con 90 ml de solución amortiguadora de fosfatos y licuar durante 2 minutos esto constituye una dilución 1:10

- 2) Fundir los medios a una temperatura de 121°C, en el autoclave o la olla express, cesar el calentamiento inmediatamente después de que se alcance la temperatura.

Dejar que se enfrien a temperatura ambiente hasta una temperatura de $55 \pm 5^\circ\text{C}$

Se mantiene la temperatura sumergiendo los tubos en un baño de agua de $45 \pm 1^\circ\text{C}$ para mantenerlos fundidos (no se conserve por más de 3 horas a esta temperatura)

Se distribuyan las cajas estériles en la mesa de trabajo sobre una superficie lisa y bien nivelada. Se marcan las cajas con agar con los datos necesarios.

- 3) Se transfieren 0.2 ml de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} a las placas con agar Baird-Parker.

Distribuye el inóculo sobre la superficie del agar con una varilla de vidrio doblada en ángulo recto estériles utilizando una para cada dilución.

Se dejan las cajas en esta posición hasta que el inóculo sea absorbido, para lograr esto las placas se pueden colocar a 35°C en una incubadora por aproximadamente una hora. Después se invierten las placas para incubar durante 45 a 48 horas a 35°C

Interpretación:

La presencia de colonias negras indican la presencia *S. aureus*. Esto es usualmente producido por contaminación humana.

Para confirmar la presencia de *S. aureus* se seleccionan las placas que tengan entre 20 y 200 colonias y se hacen las pruebas de coagulasa y termonucleasa.

Pruebas especiales:

Prueba de coagulasa.

Se siembran las colonias en tubos con 0.5 ml de caldo in fusión cerebro corazón. Se incuban a 35°C durante 24 horas. Al mismo tiempo se inoculan como testigo en la misma forma, ce pas conocidas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Se agregan al cultivo 0.2 ml de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina fisiológica (0.85%).

Se incuban en un baño de agua a 35-37°C y observar a inter valos de una hora durante seis horas.

Interpretación:

Prueba positiva: formación de coágulo total de la mezcla.

Informar la cuenta de *S. aureus* coagulasa positiva.

Prueba de termonucleasa:

La producción de nucleasa termoestable es una prioridad característica de casi todas las cepas de *S. aureus*.

La prueba es rápida y sencilla y permite confirmar su pre sencia.

En un portaobjetos limpio, se agregan 3 ml de medio agar azul de toluidina DNA fundido. Se esparcen por toda la superficie y se deja solidificar. Se hacen perforaciones de 2 mm de diametro, con una pipeta pasteur.

Se calienta el cultivo de caldo infusión cerebro corazón (BHI) en baño de agua caliente a 100 °C durante 15 minutos.

Se transfiere una gota de cada tubo a un orificio de la laminilla sin olvidar los testigos.

Se incuba en cámara humeda durante 4 horas a 35°C

Interpretación:

La aparición de un halo color de rosa alrededor de la perforación se considera una prueba positiva a termonucleasa.

El número de UFC en el producto se obtiene multiplicando la dilución seleccionada y el volumen inoculado (15, 16, 18).

AISLAMIENTO DE SALMONELLA EN CARNE

Fundamento:

Las Salmonellas presentes en un homogenizado de carne sembrado en medios de cultivo selectivos producen colonias características.

Medios de cultivo:

Agares: Verda brillante

Sulfito de bisimuto

XLD

SS

Caldos de enriquecimiento:

Caldo selenito cistina

Caldo tetrationato

Caldo lactosado

Reactivos:

- 1) Solución verde brillante al 0.1% P/V

Verde brillante 0.1 g

Agua destilada estéril cpb 100 ml

Esterilizar 15 minutos a 121 °C/ 15 libras de presión

- 2) Solución yodo-yoduro

Cristales de yodo 6.0 g

Yoduro de potasio 5.0 g

Agua destilada 20 ml

Esterilizar 15 minutos a 121°C

- 3) Solución madre amortiguadora de fosfatos P/V

Fosfato ácido de potasio 34 g

Agua destilada cbp 500 ml

Esterilizar 20 minutos a 121°C

Preparación de Madre de la solución amortiguadora de fosfatos.

Disolver el fosfato en agua destilada , ajustar el pH

7-2 con hidróxido de sodio 1 N; se utilizan aproximadamente 175 ml llevar a un litro de agua destilada es terilizar 20 minutos a 121°C y conservar en refrigeración. Tomar 1.25 ml y llevar a 1 litro de agua destilada y esterilizar 20 minutos/121°C. para sol. de trabajo.

Procedimiento:

- 1) Cortar la envoltura que contiene la muestra con tijeras estériles para no contaminar el interior de la muestra. Tomar varias partes de muestra de carne aproximadamente 250 g y de esto homogenizar 10 g con 90 ml de solución amortiguadora. Esto da la dilución 10^{-1} hacer diluciones decuples 1:9
- 2) Se pasan 15 ml de la muestra homogenizada a un vaso de licuadora y se agregan 125 ml de caldo de tetracionato con solución verde brillante al 0.1% y solución yodo-yoduro y se licuan durante 1 minuto. Posteriormente se transfieren a un tubo y se incuban a 43°C por 24 horas. Se repite la operación agregando a los otros 15 ml de muestra 125 ml de caldo selenito cistina.
- 3) Se agitan los frascos de cultivo anteriores con una - asa se siembra por estrías para obtener colonias aisladas, sobre la superficie de cuando menos 2 cajas de medios diferenciales selectivos por cada frasco. Los medios utilizados pueden ser agar verde brillante, agar sulfito de bisimuto, agar XLD o agar SS.
- 4) Las cajas inoculadas se incuban a 35°C durante 24 horas.

Interpretación:

Las colonias sospechosas de Salmonella se observan como

sigue:

- Agar verde brillante: Colonias rojas o rosas rodeadas de medio rojo.
- Agar sulfito bisumuto: Colonias rojas o rosas rodeadas de medio rojo.
- Agar XLD: Colonias de color rojo generalmente con el centro negro por la producción de H_2S
- Agar SS: Las colonias son traslúcidas, transparentes u opacas, algunas veces con un centro negro.

La muestra es positiva con una sola colonia de Salmonella

Confirmación bioquímica:

- Reactivo de Kovac

P. dimetil-aminobenzaldehído - 5 g

Alcohol amílico 75 ml

Ac clorhídrico concentrado 25 ml

Se disuelve el p-dimetil-aminobenzaldehído en alcohol amílico y después se agrega el Ac. clorhídrico lentamente la solución se debe conservar en frasco ambar.

Procedimiento:

- 1) Se seleccionan al menos 2 colonias sospechosas de cada placa, bien aisladas de otras colonias.
- 2) Se transfieren con una asa, a una serie de tubos de agar, LIA, SIM, caldo sarraco y caldo manitol, TSI.
- 3) Incubar a $35^{\circ}C$ por 24 horas.

Interpretación:

Las colonias de Salmonella. producen la siguiente reacción Agar TSI. En el fondo se observa la fermentación de la glucosa, puede haber burbujas de gas y coloración ne-

gra por la producción de H_2S .

La superficie del medio no debe cambiar por no haber fermentación de lactosa.

Agar LIA: Coloración púrpura del medio por descarboxilación de lisina, a veces se observa producción de H_2S coloreando de negro.

Agar SIM: Se observa producción de H_2S (coloración negra) producción de indol negativa (con reactivo de Kovac) Se observa movilidad por crecimiento nebuloso.

Caldo sarraco: No cambia la coloración del medio por no fermentar la sacarosa ni hidrolizar la urea.

Caldo manitol: Fermentación positiva con vire del indicador a amarillo (15, 16, 18).

LITERATURA CITADA

1. Discrosier, W.: Conservación de Alimentos, CECSA, México, D. F., 1964.
2. Domínguez, I. M.: Identificación de las Especies de que proviene la carne para consumo humano por el método de inmunodifusión. Tesis de licenciatura. Fac. Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1982.
3. Esesarte, E.: Higiene de Alimentos y Bebidas. Subsecretaría de Salud. Dirección General de Educación para la Salud México, D. F. 1983.
4. Hebert, W. J.: Inmunología Veterinaria. Ed. Acribia, Zaragoza España, 1972.
5. Laboratorio Central Veterinario Weybrindge Gran Bretaña. Manual de Técnicas de Parasitología Veterinaria. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1973.
6. Lawrie, R. A.: Ciencias de la Carne. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1967.
7. Leslie. Hudson, F. C. y Hay.: Inmunología Práctica. Ed. Jims. Barcelona, España, 1979.
8. Longreé, R. y Blacker, G.: Técnicas Sanitarias en el Manejo de los alimentos. Ed. Pax. Mex. México, D. F. 1972
9. Manev, G.: La carne y su elaboración. Tomo I. Ed. Científica-Técnica, La Habana, Cuba, 1983.
10. Manual para Inspectores Sanitarios de Mataderos y Plantas Procesadoras de Carne. Ed. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Panamericana. Tercera parte, marzo 1971.
11. Nemeseri, L.: Diagnóstico Parasitológico Veterinario. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1965.
12. Pearson, D.: The Chemical Analysis of Foods. J. A. Chur-

chil, London, 1970.

13. Priecie, J. F y Schweigert E. S.: Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos, Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1976
14. Sanz, I. C.: Enciclopedia de la Carne, Ed. Espasa-Calpe S. A. Madrid, España, 1948.
15. Secretaría de Salubridad y Asistencia, Técnicas Generales para Análisis Microbiológicos de Alimentos. Dirección General de Laboratorios de Salud Pública S. S. A. México, D. F. 1978.
16. Secretaría de Salubridad y Asistencia, Técnicas para el Análisis Microbiológico y Fisicoquímico de productos cárnicos. Dirección General de Laboratorios de Salud Pública Laboratorio Nacional de Referencia SSA. Volumen IV México D. F. 1983.
17. Svoboda, J.: Trabajos Prácticos en la Higiene de los Alimentos Ed. Universitaria, La Habana, Cuba, 1965.
18. Thatcher, F. S. y Clarck, D. S.: Análisis Microbiológico de Alimentos Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1972.
19. Velázquez, O. V.: Manual de Prácticas de Parasitología Clínica Veterinaria. Tesis de Licenciatura. Escuela de Med. Vet. y Zoot. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México, 1980.
20. Villamar, C.R.C.: Estudios Triquinoscópico de los Cerdos Sacrificados en los Rastros Periférico del Sur del D. F. (Milpa Alta, Xochimilco, Tlahuac y Topilejo). Tesis de licenciatura Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 1984.