



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FRECUENCIA Y DISTRIBUCION DE MICRO- ORGANISMOS QUE CONTAMINAN LAS FORMULAS LACTEAS

TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N
MYRIAM NASSAR LAVISTA
GUILLERMINA VAZQUEZ RIVERA
MEXICO, D. F. 1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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 DE LA TESIS

INTRODUCCION

CAPITULO I GENERALIDADES

1. Importancia de la leche materna
2. Ventajas de la alimentación al seno materno
3. Contraindicaciones de la alimentación al seno materno
4. Diferencias químicas entre la leche materna y la leche de -
vaca
5. Tipos de alimentación artificial
6. Posibles microorganismos contaminantes de la leche
7. Metodologías empleadas
 - A. Diversas metodologías
 - B. En nuestro país
8. Cuentas permitidas según la Norma Oficial Mexicana

CAPITULO II PARTE EXPERIMENTAL

1. Material
 - A. De vidrio
 - B. Equipo
 - C. Reactivos
 - D. Medios de cultivo
2. Metodología

CAPITULO III RESULTADOS

CAPITULO IV ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

CAPITULO V CONCLUSIONES

ANEXO

CAPITULO VI BIBLIOGRAFIA

I N T R O D U C C I O N

En el presente siglo tienen lugar desarrollos tecnológicos notables en la industria lechera y en el procesamiento de alimentos con especial atención de la nutrición pediátrica, esto hizo extender ampliamente la alimentación artificial de los lactantes en la mayoría de los países industrializados, con una paralela - declinación en la alimentación al seno materno.

Así mismo, con la profunda transformación social que ha tenido lugar, la alimentación al pecho es frecuentemente considerada incompatible con los estilos de vida moderna, sobre todo -- porque muchas madres trabajan fuera de casa actualmente. Por -- lo tanto, como resultado del desarrollo de la civilización y de la industrialización se ha llegado al abandono de la alimenta- -- ción al seno materno y a la elección del biberón, siendo ésta la situación prevaleciente en los países semi-industrializados de - América Latina. (21,34)

La elevada mortalidad y morbilidad actual entre los lactantes no alimentados al seno materno en muchos países en desarro-- llo, es resultado de algunas de las mismas condiciones que existían en Estados Unidos de Norteamérica y en Europa Occidental a fines del siglo pasado y comienzos del actual.

Una buena alimentación requiere, no solo disponer de un alimento nutricionalmente sano y de alta digestibilidad, sino también de un suministro de agua libre de patógenos, de medios adecuados de alimentación y educación de la población para que sean comprensibles los términos de esterilización, refrigeración y manejo higiénico, sobre todo en la preparación de las fórmulas-lácteas y su administración al niño. (14)

En algunos casos las madres no disponen de condiciones que, partiendo de un producto estéril como por ejemplo la leche en polvo, lleguen a proporcionar al niño un alimento también estéril, convirtiendo así al biberón en un vehículo de enfermedad y muerte. (39)

Cuando los requisitos para la buena alimentación con biberrón no pueden satisfacerse, todos los esfuerzos deben encaminarse a favorecer la alimentación natural. (14)

Se ha visto que uno de los principales problemas que se presentan en México son los padecimientos gastrointestinales en los lactantes, relacionados en algunos casos con la administración de leches en polvo, dicha contaminación podría adquirirse en el momento en que las personas que elaboran dichos biberones tengan algún descuido, pero no se descarta la posibilidad de que las leches en polvo utilizadas ya estén contaminadas y sean las que originen el síndrome diarreico; de esta manera, obteniendo

do la cuenta e investigando los microorganismos existentes, se -
puede advertir el riesgo potencial que podrían representar estas
leches.

CAPITULO I
GENERALIDADES

1. IMPORTANCIA DE LA LECHE MATERNA

El concepto de que, al menos en los primeros meses de vida, la madre sana debe amamantar a su hijo, se ha declarado como principio invariable puesto que la leche materna es el alimento natural y ningún otro puede substituirlo con ventaja (32). Este hecho cobra más importancia en los países subdesarrollados al ser demasiado elevado el costo de la lactancia artificial adecuada (30).

Sin embargo, los cambios tecnológicos y sociales que han llevado a la elaboración de las fórmulas lácteas y la vida productiva de la mujer en continuo ascenso, han traído como resultado el abandono de la alimentación al pecho y por lo tanto, el sacrificio del bienestar del lactante. Actualmente se ha tratado de reivindicar esta práctica tan fructífera en varios aspectos como se manifestó en la XXVII Asamblea Mundial de la Salud, al mencionar la alimentación al seno materno como la ideal, ya que promueve el desarrollo armónico tanto físico como mental del niño (3).

Son las características fisicoquímicas y el alto valor bio-

lógico que posee la leche materna, lo que la hace el alimento - ideal ya que presenta las características que debe tener la ali- mentación infantil:

Suficiente, pues el número de calorías que proporciona, lle- na satisfactoriamente los requerimientos energéticos del niño.- Completa, ya que en la dieta existen en cantidad significativa- todos los nutrientes para su fisiología normal. Equilibrada, - pues los nutrientes que se proporcionan en el alimento se en- - cuentran en cantidades proporcionales entre sí. Adecuada, ya - que se da al niño teniendo en cuenta su fisiología y su momento biológico (32, 36).

2. VENTAJAS DE LA ALIMENTACION AL SENO MATERNO

La alimentación al seno materno ofrece muchas ventajas que- la alimentación artificial no ha podido igualar, pese a los --- avances tecnológicos que se han desarrollado para mejorarla.

Estas ventajas se aprecian desde varios puntos de vista co- mo son, inmunológico, nutricional, psicológico y económico.

Inmunológico.

Cuando el niño nace, es transferido a un medio ambiente hos- til, en donde se requiere de un rápido desarrollo de sus meca--

nismos inmunológicos para su supervivencia.

Mientras se lleva a cabo la maduración de su propio sistema inmune, la leche materna le proporciona importantes elementos de resistencia. Puesto que se ha visto que los niños alimentados al seno materno experimentan una mayor resistencia a las enfermedades, que los alimentados artificialmente (3, 24).

La resistencia que ofrece la alimentación al seno materno, frente a las enfermedades gastrointestinales, es la más conocida; sin embargo, su acción se extiende a otro gran número de enfermedades, entre las más importantes están: otitis media, enfermedades respiratorias, sepsis por Gram-negativos, meningitis. (3, 17, 24).

De esta manera, la alimentación al seno materno disminuye, no sólo los índices de mortalidad, sino también los de morbilidad infantil, muy especialmente los primeros (20, 24). Este hecho es muy importante en los países en vías de desarrollo como México, donde el riesgo a la enfermedad es elevado.

Los elementos de resistencia que proporciona la leche materna comprenden, el factor de crecimiento para Lactobacillus bifidus, el factor anti-estafilocócico, las inmunoglobulinas, algunos componentes del complemento, lisozima, lactoferrina, macrófagos y linfocitos (17).

- Factor bifidus.

El conducto alimenticio del niño al nacer es estéril, sin embargo, a las pocas horas ocurre la colonización bacteriana. Se ha visto que a los 3 ó 4 días después del nacimiento, los niños alimentados al seno materno presentan una flora intestinal constituida en más del 99% por Lactobacillus bifidus, el cual se presenta como un bacilo anaerobio, Gram-positivo y no móvil; en cambio, en los niños alimentados con fórmulas se desarrolla una flora mixta (3, 17).

Aún cuando el mecanismo que favorece el establecimiento de la flora bifidobacteriana gastrointestinal no está bien entendido, se ha visto que a diferencia de la leche de vaca, en la leche materna se encuentra presente un polisacárido que contiene nitrógeno y que constituye el llamado "factor bifido". También se ha encontrado que el pH de las heces de los lactantes amamantados por sus madres es, generalmente, algo menor que el de los lactantes que reciben otras leches, evidentemente este es el resultado de la producción de ácido acético y ácido láctico por el bacilo, pensándose que posiblemente la acidificación que produce Lactobacillus bifidus inhibe la colonización intestinal por enteropatógenos en forma semejante a lo que se ha visto in vitro, donde el medio ácido inhibe la proliferación de Escherichia coli, Shigella y levaduras (5, 10, 14).

Un estudio hecho en Guatemala, en donde la incidencia de Shigella es frecuente y se acostumbra una prolongada alimentación al seno materno, demostró que los lactantes presentaron poca o ninguna enfermedad durante los primeros meses de vida con los siguientes resultados: la shigelosis sólo se presentó en 4 de 109 niños, en 3 de ellos fué asintomática y en el otro se debió a que era prematuro y no fué amamantado correctamente, además, de que su alimentación fué pobre (24).

- Factor antiestafilocócico.

Sobre las bases de las observaciones clínicas, los pediatras de la época pre-antibiótica testifican que la leche materna tiene un efecto terapéutico sobre las infecciones estafilocócicas.

Más tarde, el descubrimiento del factor antiestafilocócico en la leche materna, lo determinó como el posible responsable de la resistencia que presentan los niños alimentados al seno materno frente a las enfermedades producidas por Staphylococcus aureus (18).

Este factor de resistencia es no dializable, termoestable y al parecer se trata de un ácido graso C 18:2, distinto del ácido linoleico, aunque su caracterización final quedó incompleta (17, 18).

- Anticuerpos.

La concentración más alta de las inmunoglobulinas IgA, IgE, IgG, IgM e IgD presentes en la leche humana, se encuentra en el calostro.

La IgA es la más importante en términos de concentración relativa y características biológicas, ya que esta inmunoglobulina al igual que la IgE, se encuentran en mayor concentración -- que las otras y además tiene la capacidad de limitar la repli-- cación de patógenos virales y bacterianos en el intestino, como lo demuestra la existencia de anticuerpos en la fracción IgA -- con acción en contra de Escherichia coli y se ha podido encon-- trar en las heces del niño, por ser resistente a la digestión -- tríptica (20, 17 24, 29).

Debido a que se produce poca absorción de los anticuerpos -- administrados al lactante por medio de la alimentación al seno-- materno, no hay razón para creer que estos sean importantes en-- la resistencia a enfermedades por microorganismos que penetran -- por un conducto diferente al gastrointestinal; en cambio, ofre-- cen considerable protección contra microorganismos tales como -- virus de poliomielitis, coxsackie, cepas enteropatógenas de Es-- cherichia coli, Salmonella y otros microorganismos entéricos.

De Salmonella se han encontrado anticuerpos frente a los --

aglutinógenos H (de Salmonella H) presentes en las heces de lactantes cuyas madres habían sido inmunizadas con este antígeno. Para Escherichia coli, varios investigadores han encontrado altos títulos de anticuerpos contra Escherichia coli, en las heces de lactantes alimentados con leche humana. También se ha informado que las enfermedades con cepas enteropatógenas de Escherichia coli, son relativamente raras en los lactantes amantados por sus madres y que la alimentación al seno materno puede ayudar a controlar un brote de enteritis por Escherichia coli en los lactantes prematuros (14).

- Lisozima.

La leche humana es una rica fuente de lisozimas, e incluso se han encontrado en grandes concentraciones en las heces de los niños alimentados al seno materno, pero no en las heces de aquéllos que se alimentan con fórmulas lácteas. Dentro de sus funciones, es posible que la lisozima contribuya al desarrollo y mantenimiento de la flora intestinal especial de los niños alimentados al seno materno (24).

También existen ciertas sugerencias de que la lisozima puede actuar recíprocamente con otros componentes de la leche para alcanzar un efecto bactericida, como la lisis bacteriana, la cual no ocurre si las lisozimas no están presentes junto con los anticuerpos IgA (3, 14, 17).

Esta enzima es bacteriolítica contra la familia Enterobac-
teriaceae y bacterias Gram-positivas.

- Complemento.

En la leche humana están presentes los componentes C_3^i y C_4^i del complemento en concentraciones bajas comparadas con las del suero humano.

Aunque la actividad del componente C_3^i del complemento presente en el calostro está indeterminada en el niño amamantado, parece probable que la IgA o la IgE del calostro, activen a C_3^i in vivo, y este C_3^i activado en la leche humana debe ser potencialmente importante por sus conocidas propiedades opsonicas, anafilotóxicas y quimiotácticas (17).

- Lactoferrina.

La lactoferrina es una proteína ligada al hierro de las secreciones externas, se encuentra presente en concentraciones relativamente altas y en forma insaturada la mayor parte, en la leche humana.

La forma insaturada, inhibe la proliferación de microorganismos en el conducto gastrointestinal del niño amamantado por su madre, ya que substraer el hierro de los microorganismos. --

Con respecto a esto, se ha demostrado que la lactoferrina insaturada inhibe la proliferación de Candida albicans, Escherichia coli, y estafilococos (14, 17).

- Células inmunes.

Los leucocitos presentes en la leche humana, son células -- con capacidad inmunológica, que se encuentran en concentraciones de $2-4 \times 10^9$ /ml, de los cuales aproximadamente el 90% lo -- constituyen los macrófagos y el 10% restante, los linfocitos -- (17).

De su capacidad inmunológica, se ha reportado que los leucocitos del calostro liberan, in vitro, el factor de inhibición -- de la migración, que constituye uno de los mediadores de la inmunidad celular; también se ha dicho que las madres sensibilizadas a la proteína del bacilo tuberculoso pueden transferir a -- sus hijos, mediante la alimentación al seno materno, una hipersensibilidad retardada y en forma semejante, transferirles protección a enfermedades producidas por el género Candida (16, -- 17).

Smith, Goldman y Murillo describieron un número significativo de linfocitos capaces de sintetizar IgA y macrófagos con capacidad fagocítica en el calostro humano (17, 24).

Nutricionales.

La leche materna proporciona las calorías que satisfacen -- los requerimientos nutricionales específicos del lactante en -- forma más adecuada que las fórmulas alimenticias, por varias ra -- zones, entre las que se menciona que la cantidad de leche consu -- mida en la alimentación al seno materno es determinada en gran -- parte por el niño, con relativamente poca modificación por la -- actitud de la madre, ya que ésta desconoce la cantidad de leche consumida por su hijo y supondrá que éste se encuentra satisfe -- cho cuando deja de succionar. Por otra parte, los estudios -- realizados han mostrado que las muestras de leche materna, al -- final de la alimentación contienen niveles mucho más altos de -- lípidos y proteínas que al comienzo de la alimentación; este -- cambio en composición puede saciar al niño o en alguna forma -- señalar el cese de la alimentación (3, 14).

Por el contrario, el lactante alimentado con biberón se en -- cuentra sometido a sutiles presiones para consumir más de lo -- que le indican sus inclinaciones naturales. De este modo, la -- alimentación con biberón conduce a la sobrealimentación.

Aunque no se dispone de datos adecuados referentes al volu -- men de leche consumido por los lactantes alimentados exclusiva -- mente al seno materno, pruebas circunstanciales sugieren fuerte -- mente, que la ingestión calórica es menor en los niños amamanta --

dos por sus madres que en los alimentados con biberón. Hecho - de gran importancia, puesto que la ingestión calórica se relaciona significativamente con el aumento de peso.

De tal manera, la alimentación al seno materno es una posible medida profiláctica contra el problema de la obesidad en la vida adulta, puesto que no se efectúa la sobrealimentación a -- que conduce la alimentación artificial (14).

En cuanto a digestibilidad, la leche materna es la mejor, -- por contener una cantidad relativamente pequeña de caseína que forma un cuajo blando y floculento fácil de digerir (14, 20).

También, las grasas de la leche humana son mejor absorbidas que las de la leche de vaca, esto se explica por la disposición de los ácidos grasos en los triglicéridos, más que por los porcentajes de grasa de los ácidos grasos individuales (14).

Entre otras ventajas, está la existencia de una simbiosis - entre el recién nacido y Lactobacillus bifidus var. Pensilvanico capaz de sintetizar tiamina, que se considera un nutriente - de alta jerarquía en la nutrición humana. Aún cuando Lactobacillus bifidus proporciona la tiamina en cantidades infinitesimales, éstas constituyen un buen suministro ya que son cantidades constantes durante todo el día.

Este bacilo también proporciona glucosa a partir de la lactosa, substrato importante que constituye el alimento por excelencia del tejido nervioso, que crece tan aprisa en la época de la lactancia principalmente en los 3 primeros meses de vida, - - que es cuando se termina la mielinización de las fibras nerviosas (32).

En cuanto a la fuente de nitrógeno que proporciona la leche materna, se encuentra, además de las proteínas, una gran variedad de nucleótidos que juegan parte en el anabolismo y crecimiento del lactante (3).

En el niño con función renal fisiológicamente inmadura, la leche materna proporciona un margen de seguridad por presentar - una baja carga de solutos renales.

Psicológico.

La lactancia al seno materno representa una forma de entregar amor y seguridad, de una manera que el niño entiende. Así, - el contacto que tiene la madre al alimentar a su hijo, condiciona un mejor acercamiento, tan estrecho, que presenta una satisfacción emocional y estimulación sensorial en ambos, con la expresión de los reflejos necesarios para que la lactancia sea - - exitosa (30,36).

En el niño se presentan los reflejos de succión y deglución para poder extraer del seno la leche, por medio de la estimulación de los pezones de la madre con una suave y constante succión. La estimulación por succión es esencial para la continuación de un adecuado suministro de leche, en cambio la restricción de la succión puede llegar a inhibir la lactancia (20, 27).

Por otra parte, en la madre existen los reflejos de prolactina y salida de leche.

El reflejo de prolactina consiste en que la estimulación -- por medio de succión en el pezón, manda impulsos nerviosos a la glándula pituitaria anterior con la consiguiente secreción de prolactina, la cual se vierte en la sangre y llega al seno, produciéndose la leche.

El reflejo de salida de la leche también parte de la succión en el pezón, que manda impulsos a la pituitaria posterior y se libera oxitocina. Esto produce la contracción de células epiteliales alrededor del alvéolo permitiendo la completa salida de leche.

Este reflejo se ve afectado por el estado emocional de la madre, en el que los estados de pena, temor, ansiedad, incertidumbre y, entre otros el embarazo, pueden inhibir la salida de leche (2, 27).

Desde el punto de vista emocional el niño recibe una estimulación sensorial por medio de la alimentación al seno materno - en la cual, la salida de leche, además de satisfacerlo, le proporciona placer ante los estímulos táctiles, olfativos, de sabor y olor, brindándole seguridad, estabilidad emocional y una perspectiva sana y bien adaptada en la vida (4, 30).

Por otra parte, la madre necesita sentirse capaz de proporcionar el alimento día y noche en cantidades suficientes para satisfacer al niño, en un ambiente familiar sin perturbaciones emocionales que puedan disminuir la cantidad de su leche y le impidan recibir una sensación de placer al amamantarlo, ya que la estimulación por succión produce en la madre una respuesta generalizada en todo el cuerpo, aumentando la temperatura de la piel del seno y produciendo contracciones rítmicas del útero.

Económico.

Desde el punto de vista económico la alimentación al seno materno es la más barata, como se demuestra en el cuadro que a continuación se presenta.

Régimen de alimentación	Costo Semanal	
	Lactancia	Alim. Artificial
Costo más bajo	\$ 0.54 (\$0.90)	\$ 0.76 (\$ 0.92)
Intermedio	1.99 (1.46)	2.81 (2.78)
Liberal	3.78 (2.77)	5.54 (4.45)

Mc Kigney, J, "Economic Aspects" in "The uniqueness of human milk", Am. J. Clin. Nutr, 24 (8): 1005-1012, August 1971.

En este cuadro se hace una comparación de costos en dólares entre la lactancia natural y la alimentación artificial. El cálculo de estos costos, se hizo con el precio al menudeo de junio de 1970 de Kingston, Jamaica y los precios entre paréntesis pertenecen a los regímenes de alimentación en Washington.

Como se puede observar en el cuadro, el costo de la alimentación al seno materno siempre es más bajo que el de la alimentación artificial (26). Así pues, se tiene que considerar como se ha dicho, que la lactancia natural únicamente gasta las kilocalorías y los nutrientes adicionales necesarios para alimentar a la mujer lactante, evitándose los gastos y esfuerzos adicionales como el comprar y preparar la fórmula, cuidar que los biberones estén estériles, que el orificio del chupón sea de la medida correcta y calentar el biberón o enfriarlo si queda muy

caliente (37).

3. CONTRAINDICACIONES DE LA ALIMENTACION AL SENO MATERNO

1. Por parte de la madre.

a) Generales.

Es causa de contraindicación de la alimentación al seno materno que la madre presente enfermedades infecciosas tales como fiebre tifoidea, tuberculosis, neumonía o meningitis, ya que la condición de la madre puede ser agravada por la lactancia. Además, el niño puede estar en grave peligro de contraer enfermedades como la tuberculosis a través del contacto íntimo durante la lactancia. En el caso de que la madre padezca una enfermedad crónica que no sea infecciosa, como son cardiopatías descompensadas o evolutivas, cáncer, nefropatías con insuficiencia renal, enfermedades cardiorrenales, endocrinopatías severas etc, no es conveniente que la madre amamante a su hijo por el esfuerzo que esto significa para ella.

Una desnutrición severa, anemia importante aplásica, refractaria, o neoplasias malignas, también son consideradas con -

traíndicaciones a la alimentación al seno por carecer la madre de vitalidad para alimentar a su hijo (36).

En caso de un nuevo embarazo durante el período de lactancia, el amamantamiento del niño debe ser suspendido porque la lactancia impone un gran esfuerzo sobre la salud de la madre -- (23, 36).

La hipogaláctea es también considerada otra contraindicación y contrariamente a una creencia común, la desnutrición materna no es la causa más frecuente de hipogaláctea, mucho más importante es el vaciamiento incompleto de los senos de la madre ya que la cuantía de la secreción y la persistencia de la misma dependen de que el vaciamiento de la mama se efectúe en forma regular.

En los niños alimentados al seno materno, llega un momento en que la leche deja de ser cuantitativamente suficiente para cubrir sus demandas energéticas, lo que puede ocurrir en lapsos variables. Existen ocasiones en que la secreción láctea es tan abundante, que el peso del niño podría seguir progresando satisfactoriamente por siete, ocho o más meses; sin embargo, un niño alimentado exclusivamente al seno durante más de seis meses rehusa frecuentemente otro alimento y rechaza en especial el biberón; al hacerse insuficiente la secreción materna resulta obligado el empleo de fórmulas de leche de vaca y de otros alimen--

tos que el niño no aprendió oportunamente a ingerir estableciéndose un conflicto entre la madre y el niño, que finalmente, -- agrava la situación. Así pues, por razones de "educación alimentaria", conviene no retrasar la iniciación del destete más -- allá del cuarto o sexto mes (32, 36).

b) Drogas y/o medicamentos que se excretan en la leche materna.

Existen medicamentos cuyos efectos en el niño alimentado al seno materno, pueden ser de consecuencias importantes, por lo -- que constituyen una contraindicación temporal o permanente.

Así, la leche de una madre adicta a las drogas, como heroína, morfina o codeína, contiene pequeñas cantidades de la droga; esta cantidad que el niño recibe puede que no sea suficiente para causarle daño, pero sí puede provocar un hábito en él (23).

La penicilina puede pasar a través de la leche y producir -- una sensibilización alérgica en el niño. En el caso de algunos anticonceptivos orales que contienen grandes dosis de estrógeno y progesterona, éstos pueden suprimir la producción de leche en la madre (3).

Se ha recomendado además, no dar a mujeres que amamantan, -- antímetabolitos, la mayoría de los catárticos, drogas radioac--

tivas, anticoagulantes, metronidazol y tiouracilo.

Sólamente bajo supervisión médica pueden darse algunos anticonceptivos orales, diuréticos, barbituratos, sulfonamida, diazepán, carbonato de litio, etc (14).

c) Locales

La existencia de defectos anatómicos en el pezón de la ma--
dre tales como pezones pequeños, umbilicados u obturados, son -
una contraindicación de la alimentación al seno materno (23).

También pueden ser contraindicaciones, los desórdenes que se
presentan durante la lactancia como mastitis y abscesos en el se
no los cuales se deben a un pobre reflejo de la salida de la le
che o a la inhibición del mismo. Tales alteraciones del refle-
jo se presentan debido a influencias emocionales como dolor, --
miedo, inseguridad y pena en la madre (23, 27).

La existencia de grietas puede ser otra contraindicación --
temporal o parcial, debido a que se pueden presentar infeccio--
nes principalmente debidas a estafilococos, que entran al seno--
por las fisuras del pezón (23, 27).

2. Por parte del niño.

Las condiciones de los niños pueden contraindicar la alimentación al seno materno. Defectos congénitos, como labio y paladar hendido así como niños que presentan parálisis facial son incapaces de succionar. La prematurez también es otra de las contraindicaciones de la alimentación al seno pues el niño prematuro, no sólomente es demasiado débil para succionar, sino -- además presenta falta de vigor, angustia respiratoria o carece de los reflejos necesarios para poder hacerlo (23).

4. DIFERENCIAS QUIMICAS ENTRE LA LECHE MATERNA Y LA LECHE DE VACA.

Proteínas

La leche de vaca contiene tres veces más proteína que la leche materna, pues en ella se encuentran alrededor de 3.3 g. de proteína comparado con 1.1 g. de proteína contenidos en la leche materna (18, 20).

Las proteínas de la leche materna y de la leche de vaca son de dos clases específicas: la caseína, proteína del cuajo y lactoalbúmina y lactoglobulina que constituyen las proteínas -- del suero (20).

En la leche materna, estas protefmas de fácil metabolismo - en las que se encuentran todos los aminóácidos considerados como esenciales, constituyen el 60%, encontrándose en mayor proporción la lactoglobulina que la lactoalbúmina y la protefna -- del cuajo, una fosfoprotefna de difícil digestión constituye el 40%. Por el contrario, la leche de vaca contiene el 85% de caseína y solo el 15% de lactoalbúmina y lactoglobulina (36).

La relación más alta de lactoalbúmina y lactoglobulina a -- caseína en la leche materna que en la leche de vaca, no se ha de mostrado que sea de importancia nutricional para los niños lactantes; sin embargo, el alto contenido de caseína en la leche - de vaca, es la causa de la formación de una masa de cuajos rela tivamente mal digeridos en el estómago, si esta leche no es tra tada apropiadamente para reducir la tensión del cuajo (14).

En cuanto al contenido de aminóácidos, éstos en general, se encuentran en mayor concentración en la leche de vaca que en la leche materna. El exceso de metionina presente en la leche de vaca puede representar "stress" para el niño prematuro (3, 18).

Lípidos

Tanto en la leche materna como en la leche de vaca los triglicéridos constituyen alrededor del 89% de los lípidos totales, encontrándose además fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos -

libres en pequeñas cantidades (20).

Las grasas de la leche materna son grasas verdaderas, es -- decir, glicéridos de ácido oleico, linoleico, palmítico y esteárico, predominando el primero de ellos en un 40%; el contenido de ácido linoleico, el ácido graso considerado como esencial, -- también se encuentra en gran proporción en la leche materna que en la leche de vaca. En tanto que la leche de vaca contiene -- glicéridos de ácidos de la serie palmítica, esteárica, mirística, cáprica, caprífica, caproica, laurica y butírica. En menor -- proporción se encuentran los ácidos grasos oleico y linoleico -- que son los más digeribles (36).

A diferencia de la grasa de la leche de vaca, la de la leche materna es mucho mejor absorbida por el lactante probablemente debido a la localización del ácido palmítico en la molécula del triglicérido. El ácido palmítico de la leche materna está principalmente esterificado en la posición dos, mientras que en la grasa de la leche de vaca está casi igualmente distribuido entre las tres posiciones de la molécula de triglicérido (14).

El desdoblamiento de ácidos grasos es una reacción enzimática, que está bajo la influencia de la lipasa, siendo la leche materna una rica fuente de ésta permitiendo que haya ácidos grasos libres en una gran proporción, siendo estos la fuente de energía más importante para el recién nacido. Del 30 al 55% de las

kilocalorías de la leche materna, provienen de la grasa necesaria para la mielinización del cerebro y para el crecimiento neuronal. En cambio, la leche de vaca carece de esta enzima (14, - 18).

Carbohidratos

La lactosa es el carbohidrato presente tanto en la leche -- materna como en la leche de vaca; sin embargo, por cada 100 ml de leche, el contenido de la primera es de 6.8 g. comparado con 4.8 g. en la leche de vaca, por lo que se puede apreciar que -- una diferencia importante son las menores concentraciones de -- lactosa en la leche de vaca que en la leche materna. La leche -- materna contiene además cantidades en trazas de glucosa, galactosa, glucosamina y otros oligosacáridos conteniendo nitrógeno-- (18, 20).

Por último, la leche materna proporciona 37% de calorías procedentes de la lactosa y la leche de vaca, 29% de calorías procedentes de este componente de la dieta (14).

Vitaminas

Vitaminas tales como tiamina, riboflavina, vitamina B6, vitamina B12 y folacina están presentes en mayores cantidades en la leche de vaca que en la leche materna; sin embargo, la abu--

llición de la leche de vaca destruye vitaminas termolábiles como son la tiamina, riboflavina y el ácido ascórbico.

La leche de vaca contiene menos niacina preformada que la leche materna, pero el contenido de triptofano en la leche de vaca es mayor y así el de niacina total es similar en ambas leches.

Una importante diferencia en la administración de leche materna y leche de vaca, es que la primera es de ordinario consumida directamente del pecho y todas las vitaminas originalmente presentes en la leche son transmitidas al lactante; por el contrario, las pérdidas de vitaminas de la leche de vaca se producen durante el ordeño, el proceso, el transporte, la entrega, el almacenamiento, esterilización y/o ebullición. En el caso de muchas de las vitaminas B, el contenido inicial de ellas en la leche de vaca es suficientemente alto para que pérdidas moderadas sean de poca importancia nutricional. Cuando es ordeñada de la ubre, el contenido de vitamina C de la leche de vaca es en promedio de aproximadamente 21 mg/l. Y disminuye con el procesamiento y almacenamiento; en el momento de la compra, varios autores han encontrado que varían de 2.4 a 20.5 mg/l con una media de aproximadamente 11 mg/l, produciéndose más reducciones de la concentración de vitamina C durante el almacenamiento des

pués de la compra (14).

Minerales

Otra de las diferencias importantes entre la leche materna y la leche de vaca estriba en su composición mineral, siendo -- mayor la concentración de minerales en esta última. La leche -- de vaca contiene seis veces más fósforo, cuatro veces más calcio, tres veces más sodio y cenizas totales que la leche materna (2, 20).

En la leche materna, minerales tales como hierro, cobre y -- manganeso, están presentes en trazas, además contiene calcio, -- fósforo, potasio, sodio y cloro, los cuales disminuyen conforme -- aumenta el período de la lactancia.

De todos los minerales presentes en la leche, el hierro es -- prácticamente el elemento que no difiere mucho en ambos tipos de -- leche (20).

5. TIPOS DE ALIMENTACION ARTIFICIAL

Leche de vaca

Es bien conocido de todos, las condiciones higiénicas defec- -- tuosas que se tienen con la leche de vaca, sobre todo en las --

grandes ciudades, por lo que se procura no incluirla en la alimentación del lactante como tal. La leche de vaca proporciona 0.67 cal/ml y la diferencia en cuanto al déficit de calorías en relación a la materna, está más que nada condicionado por el déficit de hidratos de carbono, puesto que la materna tiene 7 g% y la de vaca de 4.5 - 5.0 g%.

Lecche de vaca en polvo

Existen en el mercado un sinnúmero de fórmulas lácteas, que van desde la leche condensada, hasta leches lo más semejante en su composición a la leche materna.

De todo este conglomerado de preparados comerciales, el médico pediatra necesita conocer únicamente las siguientes:

Lecche maternizada.

Es el alimento de elección, casi sustituto de la leche materna para iniciar la lactancia artificial cuando se decide no dar la alimentación al seno materno.

De éstas, deberán preferirse las siguientes:

S - 26, Enfalac y Nan. La SMA y Enfamil, si bien son fórmulas semejantes, no tienen igualadas las proporciones de lactoal-

búmina y lactoglobulina/caseína, sino que conservan la de la -
 leche de vaca. Esto es causa frecuente de distensión abdominal,
 estreñimiento y varios trastornos digestivos en el niño.

Leche semidescremada

La leche semidescremada tiene mayor cantidad de solutos, --
 principalmente calcio y fósforo, comparado con la leche mater--
 na y maternizada. Por lo tanto, la leche maternizada es mu--
 cho más parecida a la leche materna.

El exceso de solutos trae como consecuencia hiperosmolari--
 dad y por lo tanto menor índice de seguridad en estados de des--
 hidratación (diarrea).

El exceso de fosfatos en la dieta dificulta al riñón, so--
 bre todo del prematuro, a que elimine este catión, lo retiene -
 y como consecuencia elimina calcio y magnesio, además de que di--
 ficulta la absorción del calcio de la dieta. El resultado de -
 este problema a largo plazo, sería raquitismo alrededor de una--
 a tres semanas después y tetania en el período neonatal.

La leche maternizada es superior a la semidescremada para -
 iniciar la alimentación del recién nacido, sobre todo del prema--
 turo.

La leche semidescremada no tiene añadido hierro y vitaminas a la fórmula, la mayoría de las leches maternizadas tienen vitaminas A de 1500 - 2500 U/L, vitamina C 50 mg/l y vitamina D - - 400 U/L, las cuales cubren, al menos, parte de los requerimientos diarios.

El exceso de proteínas que contiene la leche semidescremada comparado con el de las leches maternizadas, puede provocar de acuerdo con los trabajos de Strand, la llamada "acidosis metabólica tardía".

Así mismo, las proteínas en las leches maternizadas conservan la proporción de lactoalbúmina - lactoglobulina y caseína de la leche materna; no así la leche en polvo descremada que -- conserva la de la leche de vaca.

La cantidad de sodio 30-32 m Eq/l de la leche semidescremada, comparada con la de la maternizada, 7 - 11 m Eq/l, puede -- ser una desventaja más en niños que tienen problema en la eliminación del sodio como son los niños prematuros, niños con insuficiencia cardíaca o renal.

Las grasas animales en las leches maternizadas han sido - - substituidas por grasas de origen vegetal como el aceite de - - maíz, oliva y soya, es decir ácidos grasos insaturados, lo que -- facilita su digestibilidad; por otro lado las fórmulas semides-

cremadas si bien tienen menor cantidad de grasas, éstas son de origen animal, ácidos grasos saturados, con menor grado de digestibilidad.

Leche entera en polvo.

Se obtiene por desecación de la leche natural íntegra de vaca, en general proporciona 5 calorías por gramo y está indicada en todo lactante mayor de 5 a 6 meses de edad.

Fórmulas especiales tipo Sobee

Las proteínas que la componen son de origen vegetal como la soya - metionina y proporcionan casi en forma completa los aminoácidos esenciales.

Las grasas son de origen vegetal del tipo de soya que dan una mayor digestibilidad. Los carbohidratos son sacarosa, dextrosa, maltosa y dextrinas.

Las indicaciones principales para determinar su administración son: alergia a la proteína de la leche de vaca, intolerancia a la lactosa, diarreas de origen alimenticio (36).

COMPARACION PROTEINAS - GRASAS - CARBOHIDRATOS. FORMULAS LACTEAS

FORMULAS	PROTEINAS		CARBOHIDRATOS	GRASAS
Leche Humana	60%, Lactoalbúmina Lactoglobulina	40%, Casefna	Lactosa	Ac. grasos tipo oleico, linoleico en más canti-- dad, más digestibilidad
Leche de vaca	15%, Lactoalbúmina Lactoglobulina	85%, Casefna	Lactosa	Ac. grasos tipo palmí-- tico, estearico, caproi-- co, butírico, láctico,-- más volátiles menor di-- gestibilidad.
Leches materni-- zadas	60%, Lactoalbúmina Lactoglobulina	40% Casefna	Lactosa	Ac. grasos insaturados-- de origen vegetal (maíz soya-oliva) más digesti-- bilidad.
Leches semi-- descremadas	15% Lactoalbúmina Lactoglobulina	85% Casefna	Lactosa	Ac. grasos saturados -- Origen animal (mante-- quilla) menor cantidad-- pero menor digestibili-- dad.
Leche entera	15% Lactoalbúmina Lactoglobulina	85% Casefna	Lactosa	Ac. grasos saturados de origen animal (mantequi-- lla) menor digestibili-- dad.
Sobee	Soya-metionina		Sacarosa Dextrosa Maltosa Dextrinas	Ac. grasos insaturados-- de origen vegetal (soya) más digestibilidad.

6. POSIBLES MICROORGANISMOS CONTAMINANTES DE LA LECHE

A) Bacterias Gram - positivas

1. Bacterias lácticas

Las bacterias más importantes en los productos lácteos, --- tanto por sus actividades bioquímicas como por su número, son - aquéllas que fermentan la lactosa dando una proporción elevada- de ácido láctico en los productos de degradación.

2. Micrococos y Estafilococos.

a) Micrococos.

Los micrococos forman parte de la flora inocua que contami- na la leche y se encuentran frecuentemente después del ordeño.- Por presentar una temperatura óptima hacia los 37°C por sus acti- vidades enzimáticas reducidas, tienen poca importancia en los - problemas referentes a la conservación y tratamiento de la le-- che.

b) Estafilococos

Este género comprende dos grupos; el más importante es el - de Staphylococcus aureus, que comprende bacterias parásitas que- poseen coagulasa y una o varias hemolisinas. Estas bacterias - son importantes desde el punto de vista de la higiene.

Existe otra especie representada por Staphylococcus epidermis que ofrece poco interés para nosotros.

3. Bacterias esporuladas (Bacillaceae)

Estas bacterias son las únicas que forman una endospora, -- que tiene la importante propiedad de resistir temperaturas elevadas. Mientras las otras bacterias se destruyen generalmente por debajo de 80°C, las esporuladas sólo mueren por encima de 100°; tienen por ello una enorme importancia tecnológica en lo que se refiere a las conservas de productos alimenticios no adicionadas de agentes conservadores.

A pesar de su termorresistencia debida a las esporas, muchas de estas bacterias son mesófilas, es decir que se desarrollan a unos 30°C y se inhiben a temperaturas superiores a 45°C. Sin embargo, existen especies termófilas, que se desarrollan bien por encima de los 60°C.

Las bacterias esporuladas no suelen presentarse en la leche cruda y en los productos lácteos que no se han calentado. Por el contrario, son responsables de la alteración de las leches hervidas o insuficientemente esterilizadas.

En los productos lácteos se encuentran representados dos -- géneros (según el Bergey's Manual):

- Bacillus: Bacterias esporuladas aerobias, con actividades enzimáticas variadas como acidificación, coagulación y proteólisis.

- Clostridium: bacterias esporuladas anaerobias, son perjudiciales, sobre todo por su producción de gas; algunas son peligrosas por sus toxinas, en especial Clostridium perfringens

4. Bacterias Gram - positivas diversas.

a) La leche fresca puede contener muchas bacterias del género Corynebacterium. El bacilo diftérico no se encuentra en la leche. Estas bacterias tienen poca importancia práctica por sus actividades poco acusadas y por su temperatura óptima elevada.

b) Bacterias propiónicas, que tienen importancia en la maduración de los quesos de pasta dura.

c) Brevibacterium: bacilos cortos que se encuentran comúnmente en las materias animales o vegetales en descomposición.

B) Bacterias Gram - negativas

1. Enterobacterias

Las enterobacterias suelen ser menos abundantes en la leche

que otras bacterias Gram - negativas; sin embargo, tienen una gran importancia desde dos puntos de vista:

- Higiénico: Varias especies de esta familia son responsables de graves enfermedades infecciosas, que pueden adquirir carácter epidémico, en el caso de los productos lácteos, las pertenecientes al género Salmonella son las más temibles; a otras especies se atribuyen infecciones gastrointestinales benignas.

- Tecnológico: La propiedad bioquímica dominante de las enterobacterias es la fermentación de los azúcares con formación de gas y ácido. Algunas especies producen sustancias viscosas o de sabor desagradable.

- a) Escherichia
- b) Enterobacter
- c) Klebsiella
- d) Citrobacter

Aparte de las bacterias coliformes, pueden encontrarse en la leche enterobacterias que no fermentan la lactosa y que son especies inocuas, como Serratia y Proteus, que son proteolíticas; pero también pueden hallarse especies patógenas, como Salmonella y más raramente Shigella.

2. Achromobacteriaceae

Esta familia comprende bacterias saprofitas. Ninguna especie es sospechosa desde el punto de vista higiénico. Aunque no tienen más que actividades enzimáticas limitadas, estas bacterias presentan interés porque forman parte esencial de la microflora psicrófila que prolifera en la leche a baja temperatura.

Se han definido tres géneros: Alcaligenes, Achromobacter y Flavobacterium.

3. Bacterias Gram negativas diversas

a) Pseudomonas: La leche contiene frecuentemente gérmenes pertenecientes a este género, transportados principalmente por las aguas impuras. Forman parte de la microflora psicrófila; son nocivos a causa de sus actividades proteolíticas y lipolíticas.

b) Brucella: Bacterias patógenas para el hombre y los animales, agentes causales de la brucelosis.

Levaduras y Mohos

Como las levaduras, los mohos se destruyen fácilmente durante la pasteurización.

Microorganismos patógenos en la leche.

A) Brucella

Con frecuencia, la leche se halla contaminada por estos microorganismos. Brucella abortus es la más frecuente en la leche de vaca.

B) Estafilococos hemolíticos

Se encuentran frecuentemente en la leche y su origen no es únicamente el animal atacado de mastitis, puesto que muchas veces la contaminación tiene lugar en la fábrica. El padecimiento por estafilococos se manifiesta sobre todo por los casos de intoxicación debido a la enterotoxina estafilocócica, y son -- principalmente los productos concentrados y desecados los causantes. La intoxicación no es muy grave en el adulto, pero sí lo es en los niños.

C) Estreptococos

El estreptococo piógeno del grupo A y el del grupo B representan un peligro en la leche por ser los causantes de la propagación de las enfermedades por estreptococos, tales como erisipela, escarlatina, amigdalitis etc.

D) Enterobacterias

Las bacterias del género Salmonella encontradas en la leche tienen diversos orígenes; vacas, personas y, sobre todo aguas contaminadas. Se multiplican en la leche a temperatura favorable. Al lado de este microorganismo poco frecuente, pueden encontrarse en los productos lácteos otras enterobacterias que constituyen un problema de importancia en nuestro medio como es Escherichia coli (1).

En un trabajo realizado para evaluar el porcentaje de portadores asintomáticos de Escherichia coli enteropatógena, se estudiaron 220 niños en dos grupos: a) 164 "sanos" b) 56 con diarrea. Los resultados encontrados fue que el 18.9% de los "sanos" tuvieron Escherichia coli enteropatógena contra 48.2% de niños con diarrea, lo que apoya la patogenicidad y el predominio de dicha bacteria en la diarrea del recién nacido (38).

Por otra parte, en un estudio realizado por Pickering y colaboradores durante un período de 22 meses, 595 niños con diarrea y 210 niños de la misma edad usados como controles, fueron atendidos 367 niños en clínicas de Houston y 438 niños en México.

Se encontró que los enteropatógenos asociados con diarrea fueron Shigella (18%), Rotavirus (14%), Salmonella (9%), E. coli

toxigénica (6%) y otros (12%) incluyendo 14 Proteus.

Los enteropatógenos fueron aislados de un gran número de niños con diarrea en un 59% de los casos, mientras que de los controles asintomáticos solo se aisló el 6%. En este estudio también se demostró: (1) mayor incidencia de diarrea en México (2) ocurrencia más común de Shigella en Houston y de Salmonella en México (3) no se aisló Escherichia coli en diarrea endémica en ambas poblaciones.

Klebsiella y Aeromonas también fueron incriminadas como organismos productores de enterotoxina en niños con diarrea, detectándose una cepa de Aeromonas y catorce cepas de Proteus - - (31).

En otra investigación efectuada para la búsqueda de enteropatógenos como posibles agentes de diarrea infantil en la ciudad de México, éstos fueron identificados en 47 de 62 casos, -- siendo Escherichia coli detectado en 29 casos y partículas de rotavirus en 16 casos (12).

Donta y colaboradores reportaron que cepas de Escherichia coli enterotoxigénica fueron aisladas en 8 (16%) de 50 niños -- mexicanos con diarrea admitidos en el hospital y en 1 de 50 niños hospitalizados por desórdenes no entéricos.

Los resultados de este estudio sugieren que cepas de E. coli enterotoxigénica son probablemente responsables de un número significativo de casos de diarrea en una población infantil de indígenas mexicanos (8).

Los resultados presentados en estos estudios apoyan la idea de que tanto Escherichia coli como otros de los géneros de la familia Enterobacteriaceae y los rotavirus juegan un papel importante en la diarrea infantil. De ahí la gran importancia -- que tiene el que las fórmulas lácteas se encuentren libres de ellos, lo que lleva a la vez a hacer hincapié en el estricto -- control que se debe tener durante el proceso de las leches en polvo y, posteriormente, al manipularlas cuando se preparan los biberones para los lactantes.

7. METODOLOGIAS EMPLEADAS

A.- DIVERSAS METODOLOGIAS

Cada metodología empleada para el análisis microbiológico de un alimento, se refiere a una parte de su población presente y por lo tanto tiene que tomar en consideración la gran versatilidad de los microorganismos en cuanto a sus demandas nutricionales y condiciones para su desarrollo (tipo y concentración de nutrientes, acidez, salinidad, estado fisiológico de la célula y las condiciones del material para estudiar (presencia de-

inhibidores, presencia de flora competitiva, etc) para el diseño de sus medios de cultivo, condiciones y procedimiento.

En el caso particular de la leche en polvo hay que considerar, que sus procesos de elaboración disminuyen o lesionan en gran medida las células que constituyen la flora microbiana de la leche de vaca ya que se somete a una desecación rápida a alta temperatura. En el proceso de atomización se utiliza un tratamiento previo de ultra-alta-temperatura (130° durante algunos segundos).

a.- Cuenta de Organismos Coliformes.

En todos los casos en los que los microorganismos coliformes se emplean como indicadores de calidad sanitaria (para mostrar malas prácticas higiénicas al manipular alimentos), la información que deben proporcionar es de orden cuantitativo ya que no basta con descubrir su presencia, sino el número que tiene un gran significado.

A pesar de la gran variedad de técnicas y de medios de cultivo utilizados, la base fundamental del recuento, sistemáticamente ha sido la capacidad para fermentar la lactosa, ya que se trata de la característica primaria del grupo. Como este atributo no es exclusivo de ellos, se han introducido agentes selectivos diversos que eliminan del recuento los casos de sinergis-

mo bacteriano y la actividad de gérmenes extraños.

El recuento puede efectuarse en medios líquidos o sólidos.- En el primer caso se sigue la técnica del número más probable y se desarrolla en etapas: prueba presuntiva, confirmatoria y completa. Según el tipo de material examinado y la especificidad requerida, el estudio utilizará una, dos o las tres pruebas.

En el caso del uso de los medios sólidos, el ensayo se corre hasta la prueba confirmatoria o puede limitarse a la presuntiva. Esta técnica es la llamada cuenta de colonias por vaciado en placa.

El principio de esta técnica se finca en una presunción cuya validez no es absoluta: cada colonia proviene de una célula viable. Muchos microorganismos desarrollan en los alimentos y en los medios de cultivo formando grupos de mayor o menor consistencia, los que a su vez se dispersan durante la homogenización de la muestra y la preparación de las diluciones, en partículas que pueden estar formadas por varias células, de tal manera que la colonia observada podría provenir de una célula o de un grupo de células viables que existen en la muestra original- (13).

Con ligeras modificaciones en cada caso, la técnica de vaciado en placa se utiliza para efectuar el recuento de la mayo-

ría de los grupos microbianos (como hongos y levaduras al igual que las bacterias mesofílicas aerobias y aún otros géneros y especies de interés en los alimentos).

El empleo de agar bilis rojo violeta para el recuento de coliformes, proporciona información completa por sí solo desde un punto de vista práctico, cuando se aplica a la leche y los lacticiños (13).

Con muy diversos fines ha sido utilizado, el medio de agar bilis rojo violeta, especialmente por los autores norteamericanos, para estudiar la viabilidad de los coliformes en productos de leche acidificados, para investigar la correlación entre el número de coliformes y la capacidad de autoconservación de un alimento, para evaluar a los microorganismos coliformes como indicadores de calidad sanitaria, para determinar los cambios cuantitativos que ocurren en la flora bacteriana durante la refrigeración de algunos alimentos y para determinar la carga total de coliformes en los alimentos con fines estadísticos. Diferentes autores han reportado resultados equivalentes, igualmente buenos, con el empleo de agar desoxicolato lactosa para el recuento de los coliformes, con rendimientos más bajos que con la técnica del número más probable, pero en períodos más cortos o con ahorro de equipo (13).

El agar bilis rojo violeta es, sin duda, el medio sólido - más comúnmente utilizado para el recuento de coliformes.

Aunque se trata de un medio selectivo, su funcionamiento óptimo se consigue cuando además, se satisfacen otras condiciones como son el tiempo y temperatura de incubación. Las lecturas - extemporáneas, especialmente las retardadas, facilitan el desarrollo de gérmenes no coliformes con apariencia de tales. Por funcionamiento óptimo hay que entender la recuperación de un número máximo de coliformes, con su típica morfología colonial y un mínimo de no coliformes, en un tiempo de incubación definido.

Por regla general, es necesario efectuar una confirmación - de los resultados a partir, tanto de las placas primarias, como de los tubos presuntivos que muestran gas después de la incubación.

La confirmación de la técnica de vaciado en placa, se hace - transfiriendo las colonias a tubos de fermentación con caldo -- lactosa bilis verde brillante, para observar la producción de - gas después de la incubación.

b. Cuenta de Bacterias Mesofílicas Aerobias.

La técnica utilizada para la cuenta de bacterias mesofílicas aerobias, es el recuento en placas cuyo fundamento se expresó anteriormente.

Esta técnica consiste en el recuento de colonias bacterianas en medios de cultivo con un soporte nutricional adecuado, libre de agentes inhibidores; de este modo se tiene el máximo número de microorganismos, cuando la incubación se ha realizado entre 20 y 37°C. En el caso de leche en polvo el medio de cultivo utilizado es agar triptona extracto de levadura, también llamado agar para cuenta estándar.

El grupo de bacterias mesofílicas aerobias es muy heterogéneo y sólo comparten sus miembros entre sí, la capacidad para formar colonias visibles en las condiciones en las que se desarrolla la prueba. Debido a la diversidad de características que exhiben las bacterias, prácticamente no es posible diseñar un medio de cultivo o una técnica que permita el crecimiento de todas las especies y variedades presentes.

Algunas bacterias desarrollan con mayor rapidez que otras dependiendo de factores diversos, como su estado fisiológico (traumatizadas por los tratamientos térmicos), la disponibilidad de nutrientes específicos en el medio de cultivo, el antag

nismo microbiano que se presenta en las poblaciones con flora heterogénea, la proporción relativa de cada grupo o especie microbiana al iniciarse la multiplicación, el pH, la temperatura de incubación, el potencial de óxidoreducción del medio y --- otras características que posean los diferentes microorganismos por su propia naturaleza, dentro de límites más o menos estrechos en cada caso. El número de colonias finalmente contadas en las placas, es el resultado del efecto de todos estos factores a lo largo de la aplicación de la técnica de análisis (13).

Consecuentemente, el recuento de bacterias mesofílicas aerobias tiene validez cuando la técnica desarrollada se ha ajustado a las condiciones que establece el método oficial. El empleo de técnicas que no han sido reconocidas como oficiales, no es útil en el control sanitario del alimento, ya que no existe una norma o límite que permita emitir una conclusión acerca de la calidad microbiológica de éste.

c. Cuenta de Hongos y Levaduras.

La técnica utilizada para cuenta de hongos y levaduras, al igual que para la de bacterias mesofílicas aerobias y la de organismo coliformes, es el recuento en placa.

La necesidad de que esta técnica recurra a condiciones y medios de cultivo selectivos es evidente, debido a que muchas bac

nismo microbiano que se presenta en las poblaciones con flora heterogénea, la proporción relativa de cada grupo o especie microbiana al iniciarse la multiplicación, el pH, la temperatura de incubación, el potencial de óxidorreducción del medio y -- otras características que posean los diferentes microorganismos por su propia naturaleza, dentro de límites más o menos estrechos en cada caso. El número de colonias finalmente contadas en las placas, es el resultado del efecto de todos estos factores a lo largo de la aplicación de la técnica de análisis (13).

Consecuentemente, el recuento de bacterias mesofílicas aerobias tiene validez cuando la técnica desarrollada se ha ajustado a las condiciones que establece el método oficial. El empleo de técnicas que no han sido reconocidas como oficiales, no es útil en el control sanitario del alimento, ya que no existe una norma o límite que permita emitir una conclusión acerca de la calidad microbiológica de éste.

c. Cuenta de Hongos y Levaduras.

La técnica utilizada para cuenta de hongos y levaduras, al igual que para la de bacterias mesofílicas aerobias y la de organismo coliformes, es el recuento en placa.

La necesidad de que esta técnica recurra a condiciones y medios de cultivo selectivos es evidente, debido a que muchas bac

terias aprovechan los mismos nutrientes y condiciones de incubación que requieren los hongos para su desarrollo. Las bacterias desarrollan más rápidamente que los hongos.

El logro de la selectividad de la técnica es difícil en la práctica, puesto que siempre se encontrarán algunos hongos especialmente susceptibles al agente o medio selectivo que se introduzca contra las bacterias (por lo tanto, no desarrollarán) y también podrán encontrarse algunas bacterias particularmente resistentes que formarán colonias sobre las placas; entonces el objetivo, es reducir al mínimo estas situaciones extremas.

Para eliminar el desarrollo bacteriano se puede recurrir a lo siguiente:

- 1) Acidificación de los medios de cultivo
- 2) Empleo de antibióticos y otras sustancias

Acidificación de los medios de cultivo.

El empleo de medios de cultivo a pH 3.5, ha prevalecido a la fecha dentro de las técnicas oficiales o recomendadas para el análisis de alimentos. Sin embargo, la acidificación del medio de cultivo hasta el nivel de 3.5 afecta negativamente el desarrollo de algunos hongos y a fin de disminuir el efecto nocivo de la alta acidez, se han ensayado diferentes ácidos con el - -

propósito de seleccionar el menos tóxico. Así, Koburger probó el efecto de los ácidos láctico, tartárico, cítrico, clorhídrico, sulfúrico y fosfórico en agar papa dextrosa a pH 3.5 encontrando una recuperación decreciente de colonias de hongos y levaduras por estos ácidos en el orden mencionado. Los valores promedio no mostraron diferencias entre los ácidos láctico y tartárico (13).

Empleo de antibióticos y otras sustancias.

Otra forma de inhibir el desarrollo bacteriano es el empleo de antibióticos como son la aureomicina, terramicina, estreptomina, cloramfenicol, gentamicina y sus combinaciones. El rosa de bengala se emplea con el mismo fin y no sólo impide el desarrollo bacteriano e inhibe el crecimiento extensivo de hongos, sino que comunica a las colonias de actinomicetos un intenso color rosa. Estas sustancias se adicionan a un medio de cultivo neutro.

Los resultados en general, muestran rendimientos más elevados de colonias, utilizando esta última forma de eliminación bacteriana que la acidificación del medio de cultivo (13).

Por otra parte se han mencionado inconvenientes adicionales como el desarrollo extendido de las colonias de hongos sobre las placas, y la inhibición de algunos hongos y levaduras aun -

sin someterlos a los efectos de tensión térmica (13).

Otros puntos de interés en la evaluación de las técnicas para el recuento de los hongos y las levaduras en los alimentos, se refieren al tipo de medios de cultivo y la temperatura de incubación. Entre los medios utilizados se incluyen el agar papa dextrosa como el más frecuente; además, el medio Sabouraud, agar para cuenta estandar, agar micófilo, agar malta y agar peptona dextrosa. En general, las demandas nutricionales de los hongos y levaduras son tan modestas, que la selección de un buen medio de cultivo base, no constituye un problema especial.

En relación con la temperatura de incubación óptima de las placas inoculadas para obtener el máximo número de colonias de hongos y levaduras, parece haber poca duda acerca del empleo de valores entre 20 a 25° y ésta suele ser la práctica más comúnmente observada. Tales límites permiten el desarrollo de los hongos en un período de 2 a 5 días.

d. Cuenta de Staphylococcus aureus

La presencia de Staphylococcus aureus en los alimentos se puede deber a una contaminación humana por manipulación, o a una contaminación de origen, esto es, cuando el animal de donde proviene el alimento ha sufrido o sufre alguna infección piógena; (28) cualquiera que sea la causa, resulta de gran importan-

cia detectar su presencia, existen además algunas especies que son capaces de producir una enterotoxina que causa intoxicación alimentaria al ingerirla.

Para detectar su presencia se utilizan los métodos de Vogel Johnson y Baird-Parker con sus respectivos medios (28):

Para la identificación de los microorganismos, el primero de los métodos permite hacer una estimación del contenido de estafilococo en el alimento aprovechando su carácter halófilo, se utiliza un procedimiento previo de enriquecimiento selectivo que consiste en añadir las muestras del alimento a un caldo soya tripticase adicionado de cloruro de sodio al 10%, se incubaba y se siembra una asada de este caldo en el medio selectivo agar de Vogel-Johnson, que permite obtener una determinación temprana de las colonias de Staphylococcus aureus coagulasa-positivo y manitol-positivo puesto que la capacidad de coagulación del plasma aparece casi siempre en forma simultánea con la capacidad de fermentación del manitol, este medio es altamente específico (9).

Los componentes que se utilizan para diferenciar las colonias de estafilococos de las de otras especies, son manitol y telurito de potasio; tratándose del primero, al degradarlo se forma un ácido que produce el vire del indicador rojo de fenol a amarillo formando una aureola alrededor de las colonias, el

segundo es reducido a telurio elemental ocasionando un ennegrecimiento de las colonias, contiene además cloruro de litio para-inhibir el desarrollo de otros microorganismos presentes en el-alimento.

En general, con este método se obtienen resultados satisfac-torios en cuanto a la determinación de la presencia de estafilo-cocos, pero como durante el procedimiento de enriquecimiento se favorece el desarrollo de estos microorganismos, se tiene como resultado una cuenta aproximada de Staphylococcus aureus por gra-mo de alimento.

En el método de Baird-Parker el recuento se efectúa directa-mente por siembra en la superficie con extensión del inóculo so-bre las placas del medio, el que se utiliza para el aislamiento selectivo y enumeración de estafilococos coagulasa-positivos al contener telurito y yema de huevo, sirve para la diferenciación de las colonias de estafilococo, por un lado por las propieda-des ya mencionadas de reducir en condiciones aerobias la sal -de telurito a telurio elemental y, además por el otro, de clari-ficar la yema de huevo formando así colonias negras rodeadas de una zona clara (13, 35).

A este método se le pueden señalar las siguientes ventajas:

- En general tiene mayor aceptación que el anterior por su especificidad y obtención de cifras más reproducibles en la cuenta.

- Es un medio selectivo.

Pero tiene como desventajas que:

- Algunas cepas de Proteus vulgaris forman colonias indistinguibles de las de Staphylococcus aureus.

- Algunas especies de estreptococos del grupo D, micrococcos, corinebacterias y algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae crecen en el medio Baird-Parker formando colonias negras, pero de ninguna manera son capaces de -- aclarar la yema de huevo.

- Económicamente resulta un medio costoso.

- Algunas cepas de Staphylococcus aureus no patógenas, no producen aclaramiento de la yema de huevo por carecer de la enzima lecitinasa.

e. Investigación para la determinación de Salmonella.

Los procedimientos recomendados actualmente para detectar - la contaminación por Salmonella en los productos lácteos, que -

durante su elaboración se sometieron a un proceso de secado, involucran varios pasos, que son: pre-enriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento, selección bioquímica y confirmación serológica. Estos procedimientos son laboriosos, requieren de tiempo y personal bien adiestrado.

La serie de pasos anteriormente mencionada es explicable -- por las siguientes razones: la escasez de microorganismos de este género, la posibilidad de una merma en su vitalidad, la complejidad y en ocasiones abundancia de la flora que suele acompañarla en los alimentos. Esta flora por una parte, puede ejercer un efecto antagónico más o menos pronunciado, y por otra, - ciertos miembros de ella exhiben características muy cercanas a las de Salmonella, lo que obliga a la inclusión de un mayor número de pruebas en el análisis (13, 33).

A continuación se explica cada etapa de la metodología en particular.

Pre-enriquecimiento.

En esta etapa se pretende restituir la vitalidad de los microorganismos dañados.

Durante el procesamiento de algunos alimentos, la acción del calor, la desecación, diversas sustancias antibacterianas,

la congelación, el efecto de la acidez, o una combinación de ellos, suele disminuir notablemente el número de microorganismos y afectan ostensiblemente la viabilidad de los sobrevivientes. Al lado de esta situación de tensión celular, la concurrencia de otros factores condujeron a la incorporación de los medios de pre-enriquecimiento para el aislamiento de Salmonella a partir del alimento; su escaso número después del tratamiento, una flora asociada en proporción generalmente elevada, muchas células de Salmonella probablemente se debilitan fisiológicamente por el proceso de tensión y otras tantas mueren rápidamente después de la manufactura (13, 33). Otros factores contribuyentes son: que las células lesionadas por el proceso de elaboración de la leche en polvo, pueden ser sensibles a agentes selectivos o tener mayores necesidades nutricionales para su reparación y subsecuente desarrollo.

El medio de pre-enriquecimiento es el primer medio ambiente al que los microorganismos del alimento se exponen después de su elaboración, y en el cual estas células, de un estado casi seco, se someten a hidratación, reparan cualquier lesión en su integridad, y crecen. Por lo tanto, el medio y condiciones de rehidratación usados para aislar Salmonella en el paso de pre-enriquecimiento, deberán tener las siguientes características: a) facilitar la reparación de células debilitadas por deshidratación y almacenaje, b) permitir un crecimiento relativamente rápido de Salmonella y c) preferiblemente ayudar a vencer la --

competencia de microorganismos asociados durante el crecimiento (33).

El medio de pre-enriquecimiento utilizado para la leche en polvo es agua destilada con verde brillante.

Enriquecimiento.

Los medios de enriquecimiento contienen sustancias inhibitorias, con ellos se pretende, por una parte favorecer la multiplicación de Salmonella y por otra, impedir la flora asociada.-

Dos grupos de medio de enriquecimiento se utilizan comunmente con mayor profusión.

a) El grupo del caldo tetracionato: bilis-verde brillante o medio de Kauffman, caldo tetracionato sulfatiazol bilis verde brillante y caldo tetracionato novobiocina.

b) El grupo del caldo selenito: caldo selenito F, caldo -- selenito cistina, caldo verde brillante, caldo selenito sulfa - verde brillante y caldo selenito dulcitol.

En el grupo del caldo tetracionato, el medio contiene una - fuente de nitrógeno orgánico a base de peptona, triptona, ex- -

tracto de carne o de levadura, adicionado según el caso, de sales biliares o novobiacina para inhibir las bacterias Gram positivas; verde brillante para inhibir además de estas bacterias a organismos coliformes; carbonato de calcio para regular el pH, neutralizando el ácido que se va generando y tiosulfato de sodio que parcialmente pasa a tetracionato de sodio cuando se adiciona el yodo antes de inocular la muestra, tiene un efecto tóxico sobre las bacterias sensibles (13).

En el grupo del caldo selenito, los medios también contienen una fuente de nitrógeno a base de triptona y peptona; los fosfatos tienen un efecto regulador del pH y la cistina favorece el desarrollo de Salmonella (13).

Ni el caldo selenito, ni el caldo tetracionato en cualquiera de sus variantes, permiten el crecimiento de todas las especies de Salmonella, y el acuerdo, de hecho universal, es en el sentido de utilizar sistemáticamente ambos a la vez, ya que no es fácil prever la ventaja de utilizar uno u otro caldo de enriquecimiento.

Aislamiento.

Como consecuencia del empleo de los medios de enriquecimiento, se obtiene después de la incubación, una flora mixta en los caldos y a partir de ellos se procede al aislamiento de Salmone

lla. En esta tercera etapa se hace uso de medios sólidos. Para ser eficientes deberán mantener un efecto inhibitorio sobre la flora asociada, estimular la formación de colonias de Salmonella y finalmente comunicar características diferenciables respecto a las colonias de otros gérmenes.

Los medios sólidos utilizados, de acuerdo a su capacidad -- selectiva, se agrupan de tres maneras:

a) Ligeramente selectivos: medio de Endo, agar -eosina---- azul de metileno o agar EMB y medio de Mac Conkey.

b) Moderadamente selectivos: agar DCLS, agar desoxicolato-citrato, agar SS y XLD.

c) Fuertemente selectivos: agar verde brillante y agar sulfito de bismuto.

La experiencia ha mostrado que la conducción más correcta del análisis incluye el empleo de dos medios (uno moderado y -- otro fuertemente selectivo) para cada caldo de enriquecimiento-- por muestra examinada (13).

Estos medios de cultivo contemplan un problema singular que surge de dos hechos: la abundancia y variedad de la flora aso-- ciada y la eventual escasez de células de Salmonella o la - --

existencia de éstas con desusual sensibilidad a los agentes - inhibitorios. El primero se relaciona con la especificidad y - el segundo con la sensibilidad del medio de cultivo seleccionado. Obviamente al tratar de conferirle al medio una mayor especificidad, se afecta la sensibilidad del medio, pues ello solo se consigue aumentando la concentración o la fuerza del agente-inhibidor incorporado. Del mismo modo, para favorecer el desarrollo de las células de Salmonella especialmente susceptibles al efecto de sustancias antibacterianas, hay que reducir la concentración de éstas, lo que da lugar también a un desarrollo -- más exuberante de la flora indeseada sobre las placas, mermando la especificidad.

Pruebas bioquímicas.

La identificación bioquímica de las colonias se efectúa en medios de cultivo que llevan incorporado un sistema sencillo o múltiple de indicadores y ningún elemento restrictivo para la multiplicación bacteriana. Durante esta etapa se pretende conocer el perfil bioquímico de las cepas en estudio para compararlo con el que generalmente exhiben las cepas del género Salmonella.

Esta identificación es presuntiva al concluir las pruebas, - debido a la existencia de cepas de Salmonella que se apartan de los lineamientos típicos del género y de cepas de otros géneros

que pueden comportarse en forma similar a ella. Por lo tanto, para una identificación más confiable, se requieren datos adicionales que constan además de las características de las colonias en los medios diferenciables y las pruebas de aglutinación con los sueros de grupo al menos.

Pruebas serológicas.

Las pruebas de aglutinación de las cepas presuntivamente -- identificadas como Salmonella, conducen al diagnóstico final -- del género, la especie y el serotipo.

La disponibilidad de sueros flagelares y somáticos para este fin, suele estar limitada a ciertos laboratorios.

B.- EN NUESTRO PAIS

Las metodologías empleadas actualmente en nuestro país para el análisis microbiológico de la leche en polvo, son las que se señalan en las normas oficiales mexicanas para la cuenta de hongos y levaduras, de organismos coliformes, de bacterias mesofílicas aerobias, además de la investigación para la identificación de Salmonella en alimentos, pero con algunas modificaciones que han resultado de experiencias y estudios realizados en la Dirección General de Laboratorios de Control y Salud Pública de la Secretaría de Salubridad y Asistencia. De tales modificaci

ciones se hablará más adelante al tratar cada metodología en particular.

La Dirección General de Laboratorios de Control y Salud Pública no realiza la investigación de Staphylococcus aureus en el análisis microbiológico de la leche en polvo; sin embargo, se ha incluido en este trabajo de tesis ya que su presencia en el alimento constituye un riesgo a la salud pública.

a. Cuenta de organismos coliformes.

La técnica utilizada es la cuenta de colonias por vaciado en placa, en la que se utiliza el medio de agar rojo violeta bilis y un volumen de 5 ml de muestra de la dilución 1:10, ya que al tener un volumen que no es muy pequeño hay mayor oportunidad de encontrar células viables de coliformes.

En caso de duda acerca del tipo de colonias obtenidas en el medio de cultivo después de la incubación se efectúa una confirmación, transfiriendo las colonias a tubos de fermentación con caldo lactosa bilis verde brillante, para observar la producción de gas, cosa que no se menciona en la norma oficial, aún cuando es de gran ayuda para no dar resultados falsos (28).

b. Cuenta de bacterias mesofílicas aerobias.

La modificación en esta técnica consiste en adicionar cloruro de trifeníl tetrazolio al medio agar-triptona-extracto de levadura, con el objeto de teñir las colonias de rojo y evitar confusiones con los grumos de leche que pueden quedar en la placa (28).

c. Cuenta de hongos y levaduras.

La norma oficial especifica, que de cada dilución de la muestra, se coloque 1 ml en las cajas Petri y después se agregue el medio agar papa dextrosa acidificado. En la modificación que se hizo a esta técnica, está el utilizar 5 ml de la dilución 1:10 de la muestra, ya que estos microorganismos no sobreviven con facilidad a los tratamientos térmicos que se utilizan en el proceso de obtención de la leche en polvo, luego entonces, con un volumen de muestra mayor y una dilución pequeña, se tendrá la oportunidad de tener mayor cantidad de muestra y por lo tanto más posibilidad de encontrar hongos y levaduras que pudieron haber sobrevivido o bien contaminar la muestra después del proceso de calentamiento (28).

d. Cuenta de Staphylococcus aureus.

La metodología empleada es la misma que señala la norma oficial, para la técnica de Baird-Parker, cuyo recuento se efectúa directamente en placas obtenidas por la técnica de inoculación en superficie (28).

e. Investigación para la determinación de Salmonella.

La única modificación a esta metodología, se hizo en la etapa de pre-enriquecimiento, en donde el medio utilizado está formado tan solo por dos componentes que son agua destilada y una sustancia inhibitoria como verde brillante y cristal violeta -- (28).

En la literatura se recomienda utilizar verde brillante en el medio de pre-enriquecimiento, pero en la Dirección General de Laboratorios de Control y Salud Pública, se ha adoptado el uso de una solución de cristal violeta al 0.1%, por ser menos tóxico a las células dañadas en el proceso de elaboración de la leche en polvo, las cuales presentan una hipersensibilidad a los agentes selectivos.

8.- CUENTAS PERMITIDAS SEGUN LA NORMA OFICIAL MEXICANA

Leche en polvo entera, semidescremada y descremada de consumo directo.

Mesofílicos aerobios máximo	10 000 col/g
Organismos coliformes máximo	10 col/g
Hongos máximo	10 col/g
<u>Salmonella, Shigella</u>	negativo
<u>Staphylococcus aureus</u>	negativo

CAPITULO II
PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIAL

A. De vidrio

Cajas de Petri

Matraces Erlenmeyer de 300 ml

Matraces Erlenmeyer de 500 ml

Matraces Erlenmeyer de 1000 ml

Frascos con tapón esmerilado de 250 ml

Frascos reactivo de 250 ml

Frascos de boca ancha con tapa de rosca de 1000 ml

Frascos pequeños de boca ancha (tipo Gerber)

Probeta de 100 ml

Probeta de 1000 ml

Tubos de ensaye de 12 x 75

Tubos de ensaye de 13 x 100

Tubos de ensaye de 16 x 150

Portaobjetos

Pipetas graduadas de 1 ml

Pipetas graduadas de 2 ml

Pipetas graduadas de 5 ml

Pipetas graduadas de 10 ml

Varillas de vidrio dobladas en ángulo recto

Cucharas de mango largo

Abrelatas

Separador de yema

Tripié

Tela de alambre con asbesto

Mechero Fisher

Mechero Bunsen

Asas bacteriológicas calibradas y sin calibrar

Gradillas para tubos

Cestos

B. Equipo

Baño maría con termostato

Autoclave

Horno

Refrigerador

Balanza analítica

Balanza granataria

Incubadora

Microscopio

Ap. cuenta colonias

Contador

C. Reactivos

Solución estéril de Ac. tartárico al 10%

Solución yodo-yoduro

Solución verde brillante al 0.1%

Solución de cloruro de trifenil tetrazolio al 1.0%

Solución de hidróxido de sodio 1.0 N

Solución de hidróxido de sodio 0.1 N

Solución de cristal violeta al 0.1%

Solución reguladora diluyente

Solución de telurito de potasio

Solución de cloruro de sodio al 0.85%

Indicador de azul de bromotimol

Rojo de metilo

Reactivo de Ehrlich

Solución de alfa naftol al 5%

Solución de hidróxido de potasio al 40%

Solución de alcohol - acetona

Solución de cristal violeta (coloración de Gram)

Lugol (coloración de Gram)

Safranina (coloración de Gram)

D. Medios de Cultivo

Agar rojo violeta bilis

Agar Baird - Parker

Agar tripton extracto de levadura

Agar papa dextrosa

Agar xilosa lisina desoxicolato

Agar eosina azul de metileno

Agar Mac Conkey

Agar Kligler

Agar triple azúcar hierro

Agar hierro lisina

Agar Citrato de Simmons

Medio de SIM

Caldo selenito cistina

Caldo Kauffman

Caldo manitol

Caldo sarraco

Caldo rojo de metilo-Voges Proskauer

2. Metodología

Se analizaron cien muestras de leche en polvo escogidas al azar y de diferentes marcas comerciales.

Si se trata de una lata engargolada, se limpia la tapa perfectamente con un algodón con alcohol y se abre con un abrelatas esterilizado, cuidando de no contaminar el interior con los dedos o cualquier utensilio no esterilizado.

Para latas con tapas a presión se limpia la tapa de protección que generalmente es de lámina delgada, con un algodón con alcohol y se corta por el centro con unas tijeras esterilizadas.

Una vez realizado esto, se pesan 9.5 gramos de la muestra obtenidos de diferentes zonas, auxiliándose de una cuchara de mango largo esterilizada en un frasco esterilizado. Se agregan-

90 ml de solución diluyente de fosfatos mantenida a una temperatura de 45°C.

Se agita perfectamente hasta obtener la disolución completa y una suspensión homogénea del polvo. Esto constituye la dilución 1:10.

Generalmente para la leche en polvo, las diluciones 1:10 y 1:100 son suficientes. Si se trata de leches en que se sospechen cuentas más altas, se prepara un mayor número de diluciones hasta 1:1000.

Una vez fundidos los medios, se dejan enfriar a temperatura ambiente hasta alcanzar aproximadamente 50-55°C y entonces se mantienen en un baño a 45± 1°C.

Se distribuyen las cajas Petri en la mesa de trabajo cuidando que sea una superficie bien nivelada. Se identifica claramente cada caja anotando en ella el número de la muestra, la dilución que representa, así como la fecha de incubación y la determinación que se realiza.

Efectuado lo anterior se procede a realizar a cada muestra las siguientes determinaciones:

Cuenta de organismos coliformes

Se inoculan 5 ml de la dilución 1:10 distribuyendo el -- inóculo en dos cajas, con 2 y 3 ml respectivamente, se desta-- pan éstas lo suficiente para aplicar la pipeta en el fondo de la caja mientras escurre el líquido.

A cada caja inoculada, se adiciona 12-15 ml de medio Agar-Rojo violeta bilis fundido y enfriado a baño María a 45°C e -- inmediatamente se incorpora el inóculo al medio por rotación -- de las cajas alternando movimientos circulares y rectos de izquierda a derecha, evitando el derrame o contacto del medio -- con la cubierta de la caja y se deja solidificar.

Sobre la superficie solidificada se adicionan 3ml del mismo medio para así limitar el crecimiento de las colonias.

Se incuban las cajas en posición invertida a 35°C por 24 - horas.

Se cuentan las colonias de color rojo obscuro, con halo de precipitación y diámetro de 0.5 mm ó mayor.

Se suman el número de colonias de las dos cajas y se multi-- plica por dos para obtener la cuenta en 1.0 gramo.

Cuenta estándar de colonias mesofílicas en placa.

Procediendo como se indica anteriormente, se inoculan 1 ml y 0.1 ml de la dilución 1:10 en dos cajas.

A cada caja inoculada, se adiciona 12-15 ml del medio Agar Triptona Extracto de Levadura, previamente fundido y enfriado a 45°C, se mezcla y se deja solidificar.

Se agrega una capa de 4 ml del mismo, adicionado de 0.5 ml de una solución de cloruro de Trifenil tetrazolio al 1% por cada 100 ml de medio.

Se dejan solidificar, se incuban las cajas en posición invertida a 35°C por 72 horas.

Se escogen las cajas que presentan entre 30 y 300 colonias y se multiplica por la recíproca de la dilución.

Cuenta de Hongos y de Levaduras.

Se inoculan 5 ml de la dilución 1:10 en dos cajas, distribuyendo 2 y 3 ml, como se indicó anteriormente.

Se agregan 15 ml del medio Agar Papa Dextrosa acidificado, fundido y templado a 45°C, se mezcla y se deja solidificar.

Se incuban las cajas en posición invertida a 22°C durante cinco días. Se cuentan y suman las colonias que aparezcan en las dos cajas y se multiplica por dos para obtener la cuenta - en 1.0 gramo.

Investigación de Staphylococcus aureus

Se inocula 0.1 ml de la dilución 1:10 sobre una caja que contiene medio de Baird - Parker, el inóculo se extiende con una varilla de vidrio efectuando movimientos rectos de arriba-hacia abajo y de izquierda a derecha. Las cajas se incuban en posición invertida a 35°C durante 24-48 horas.

Las colonias sospechosas se siembran en 0.5 ml de caldo - infusión cerebro corazón y se procede a incubar a 35°C durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se realiza la prueba de la coagulasa, adicionando a 0.2 ml de caldo, 0.2 ml de plasma diluido 1:1 y se incuba a 35°C 24 horas, para observar si existe o no la formación del coágulo.

Investigación de Salmonella

Preenriquecimiento

Se pesan 50 gramos de leche en polvo y se añaden a 450 ml de agua destilada estéril, ajustando el pH 6.6 - 6.8 \pm 0.2 con

NaOH 1.0 N estéril.

Se agregan 2 ml de cristal violeta al 0.1% y se incuba a 35°C durante 24 horas.

Enriquecimiento

Se agita el cultivo anterior y se transfiere 1 ml de inóculo a un tubo conteniendo 10 ml de caldo Selenito Cistina y 1.0 ml a otro conteniendo 10 ml de caldo Kauffman, se homogeniza y se incuba a 35°C durante 24 horas.

Aislamiento

Se agitan los tubos de los cultivos anteriores y se siembra sobre la superficie de tres cajas de medios diferenciales-selectivos por cada tubo, se utilizan los medios de: Agar EMB, Agar XLD y Agar Mac. Conkey. Se incuban las cajas en posición invertida a 35°C por 24 horas.

Identificación bioquímica

Se seleccionan las colonias sospechosas de cada caja, que se encuentren bien aisladas. Se transfiere de cada una, con asa bacteriológica sin calibrar, una colonia a una serie de tubos: Agar Kligler, Agar TSI, Agar LIA, Agar Citrato de Simmons, Agar SIM, Caldo Sarraco, Caldo Manitol, Caldo Ro-

jo de Metilo - Voges Proskauer. Se incuban a 37°C durante 24-
horas, al cabo de este tiempo se hace la lectura correspondiente
te y los resultados obtenidos se interpretan en tablas.

ESQUEMA DE LA TECNICA

9.5 g de muestra

+

90 ml de sol. diluyente



agitar

dilución 1:10

1 ml →

Cuenta estándar de mesó-
filos aerobios

0.1 ml →

(Agar triptona extracto-
de levadura) incubar --
35°C, 72 h.

2 ml →

Cuenta de coliformes

3 ml →

(Agar Rojo Violeta Bilis)
incubar 35°C, 24 h.

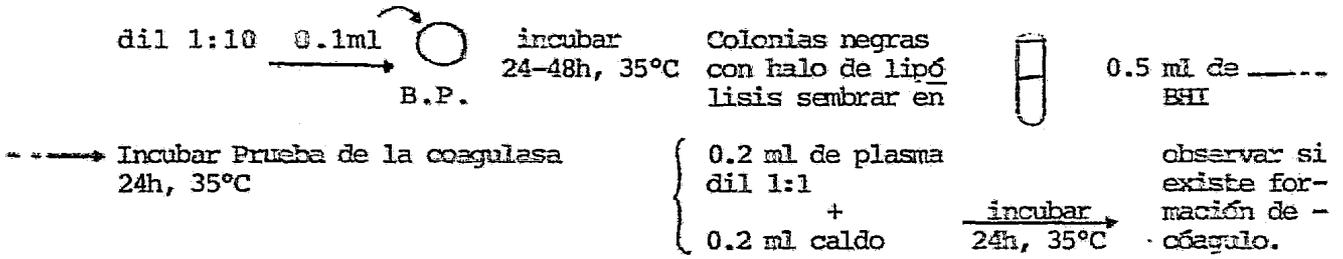
2 ml →

Cuenta de hongos y leva-
duras

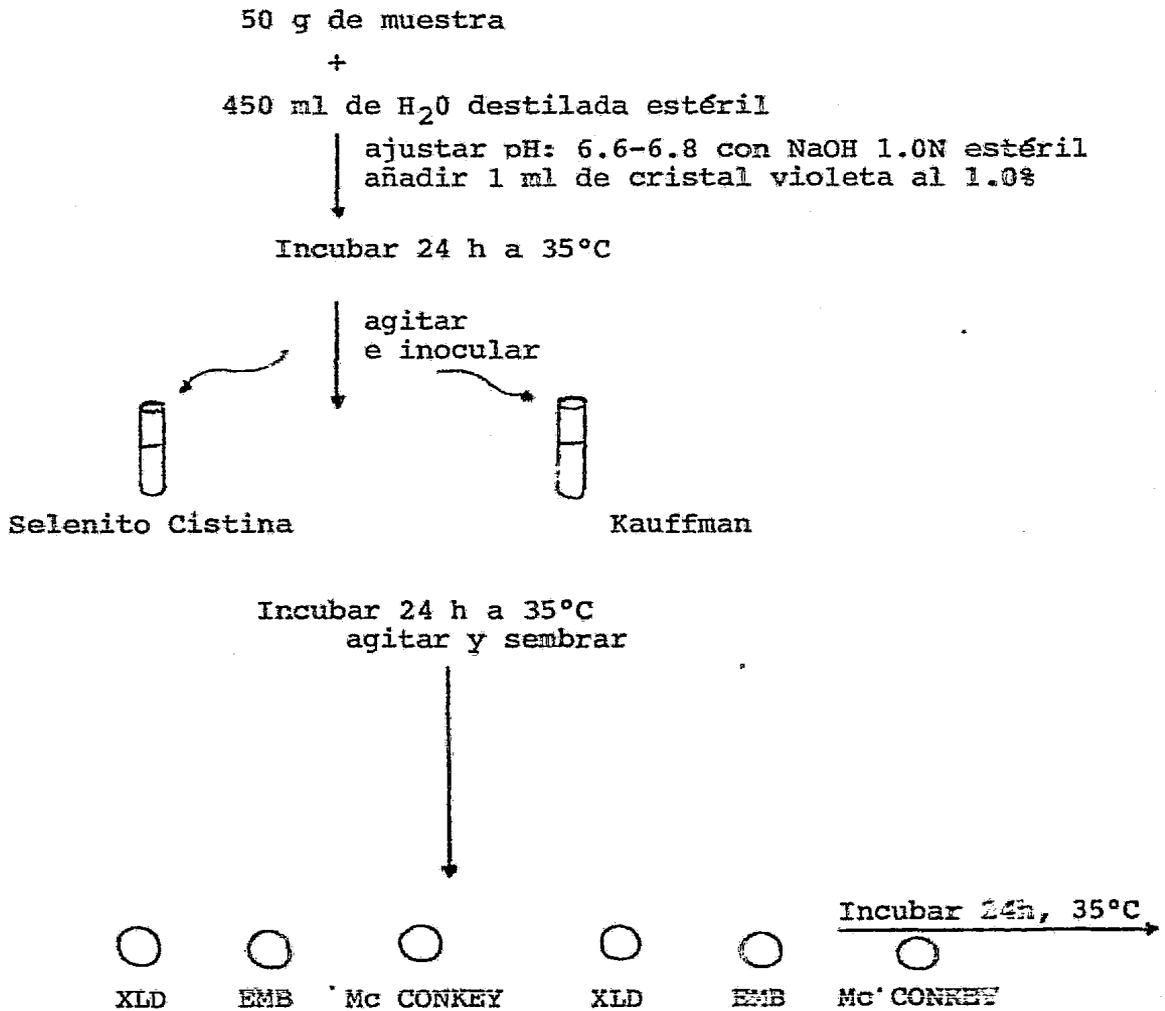
3 ml →

(Agar Papa Dextrosa)
incubar 22°C, 5 días.

Investigación de Staphylococcus aureus.



Investigación de Salmonella



tomar una asada de una
colonia bien aislada
e inocular en →

Klieger
Citrato de
Simmons
TSI
LIA
SIM

Surraco incubar 24h, 35°C →
Manitol
Rojo de Me
tilo
Voges Pros
kauer

↓
Efectuar lectura
correspondiente-
e interpretar en
tablas.

CAPITULO III

RESULTADOS

Muestra	Marca	Lote	Colif/gr	Mesófilos aerobios/gr	Hongos/gr	Levaduras/gr	<u>S. aureus</u>
1	Nan	A, X ₃ ACN	Menos de 10	Menos de 10	Menos de 10	Menos de 10	Negativo
2	"	"	"	"	"	"	"
3	"	"	"	"	"	"	"
4	"	"	"	10	"	"	"
5	"	"	"	10	"	"	"
6	"	"	"	10	"	"	"
7	"	"	"	20	"	"	"
8	"	"	"	20	"	"	"
9	"	"	"	20	"	2	"
10	"	AK 105 ACN	"	Menos de 10	"	Menos de 10	"
11	"	"	"	20	"	"	"
12	"	"	"	30	"	"	"
13	"	AI X ₃ ACN	"	Menos de 10	"	"	"
14	"	"	"	"	"	"	"
15	"	"	"	30	"	"	"
16	"	21 URA RCN	"	100	"	"	"
17	"	21 URR ACN	"	Menos de 10	"	"	"
18	"	"	"	"	"	"	"
19	"	"	"	"	"	"	"
20	"	"	"	"	"	"	"
21	"	"	"	"	4	"	"
22	"	"	"	10	Menos de 10	"	"
23	"	"	"	20	"	"	"
24	"	"	"	20	"	"	"
25	"	"	"	30	2	"	"
26	"	21 URP ECN	"	100	"	"	"
27	"	21 URT ACN	"	10	"	"	"
28	"	"	"	10	"	"	"

Núm de muestra	Marca	Lote	Colif/gr	Mesófilos aerobios/gr	Hongos/gr	Levaduras/gr	<u>S. aureus</u>
1	Pleni lac	ZB 20	Menos de 10	Menos de 10	Menos de 10	Menos de 10	Negativo
2	"	"	"	"	"	"	"
3	"	"	"	"	"	"	"
4	"	"	"	"	"	"	"
5	"	"	"	"	"	"	"
6	"	"	"	"	"	"	"
7	"	"	"	"	"	"	"
8	"	"	"	"	"	"	"
9	"	"	"	"	"	"	"
10	"	"	"	"	"	"	"
11	"	"	"	"	"	"	"
12	"	"	"	10	"	"	"
13	"	"	"	10	"	"	"
14	"	"	"	10	"	"	"
15	"	"	"	10	"	"	"
16	"	"	"	10	"	"	"
17	"	"	"	10	2	"	"
18	"	"	"	10	Menos de 10	2	"
19	"	"	"	20	"	Menos de 10	"
20	"	"	"	20	"	"	"
21	"	"	"	20	2	"	"
22	"	"	"	30	Menos de 10	"	"
23	"	"	"	40	"	"	"

Núm de muestra	Marca	Lote	Colif/gr	Mesófilos aerobios/gr	Hongos/gr	Levaduras/gr	<u>S. aureus</u>
1	Conlac	ZB 12	Menos de 10	200	Menos de 10	Menos de 10	negativo
2	"	"	"	300	"	"	"
3	"	"	"	300	"	"	"
4	"	"	"	300	"	"	"
5	"	"	"	300	2	"	"
6	"	"	"	400	Menos de 10	"	"
7	"	"	"	400	"	"	"
8	"	"	"	400	6	"	"
9	"	"	"	500	Menos de 10	"	"
10	"	"	"	500	"	"	"
11	"	"	"	500	"	"	"
12	"	"	"	500	2	"	"

Núm de muestra	Marca	Lote	Colif/gr	Mesófilos aerobios/gr	Hongos/gr	Levaduras/gr	<u>S. aureus</u>
1	Enfa-lac	CDM 86	Menos de 10	200	2	Menos de 10	negativo
2	"	"	"	200	12	"	"
3	"	"	"	300	menos de 10	"	"
4	"	"	"	300	2	"	"
5	"	"	"	300	2	"	"
6	"	"	4	300	14	"	"
7	"	CFM03	Menos de 10	300	8	"	"
8	"	CFM06	"	200	8	"	<u>Bacillus-alvei</u>
9	"	"	"	300	6	"	"
10	"	CFM03	"	300	Menos de 10	"	"
11	"	"	"	300	4	"	"

Núm de muestra	Marca	Lote	Colif/gr	Mesófilos aerobios/gr	Hongos/gr	Levaduras/gr	<u>S. aureus</u>
1	Sobee	CAE20	Menos de 10	40	Menos de 10	Menos de 10	negativo
2	"	"	"	1200	"	"	"
3	"	CDE76	"	400	6	"	"
4	"	GCE51	"	100	Menos de 10	"	"
5	"	"	"	100	2	"	"
6	"	"	"	200	4	"	"
7	"	"	"	200	4	"	"
8	"	"	"	400	2	"	"
9	"	"	"	500	2	"	"

Núm de muestra	Marca	Lote	Colif/gr	Mesófilos aerobios/gr	Hongos/gr	Levaduras/gr	<u>S. aureus</u>
1	Nestlé no	201177 BCN	Menos de 10	Menos de 10	Menos de 10	Menos de 10	Negativo
2	"	"	"	"	"	"	"
3	"	"	"	"	"	"	"
4	"	"	"	"	"	"	"
5	"	"	"	"	"	"	"
6	"	"	"	"	2	"	"
7	"	"	"	"	"	"	"
8	"	"	"	10	Menos de 10	"	"

Núm de muestra	Marca	Lote	Colif/gr	Mesófilos aerobios/gr	Hongos/gr	Levaduras/gr	<u>S. aureus</u>
1	V modifi cada pro teinas	6I	Menos de 10	500	Menos de 10	Menos de 10	Negativo
2	"	H20	"	600	"	"	"
3	"	"	"	600	"	"	"
4	"	"	"	700	"	2	"
5	"	YH20	"	400	"	Menos de 10	"
6	"	"	"	400	2	"	"
7	"	"	"	500	Menos de 10	"	"

Núm de muestra	Marca	Lote	Colif/gr	Mesófilos aerobios/gr	Hongos/gr	Levaduras/gr	<u>S. aureus</u>
1	Pelargon	22UC TAIN	Menos de 10	2 200	Menos de 10	Menos de 10	negativo

Núm de muestra	Marca	Lote	Colif/gr	Mesófilos aerobios/gr	Hongos/gr	Levaduras/gr	<u>S. aureus</u>
1	Nesbrum	80MP LEIN	Menos de 10	40	Menos de 10	Menos de 10	negativo

Número de muestra	Marca	Lote	Microorganismos
3	Nan	A,XO ₃ AON	<u>Serratia licuefa</u> <u>ciens</u>
7	"	"	<u>Klebsiella sp.</u>

Número de muestra	Marca	Lote	Microorganismos
1	V Modificada Proteínas	6 I	<u>Escherichia coli</u>
7	"	YH 20	<u>Serratia licuefa</u> <u>ciens</u>

Número de muestra	Marca	Lote	Microorganismos
1	Sobee	CAE 20	<u>Citrobacter diversus</u>
2	"	"	<u>Escherichia coli</u>
4	"	GCE 15	<u>Escherichia coli</u>
6	"	"	<u>Citrobacter freundii</u>
8	"	"	<u>Enterobacter aerogenes</u> <u>Citrobacter freundii</u>
9	"	"	<u>Proteus rettgeri</u> <u>Klebsiella sp</u>

Número de muestra	Marca	Lote	Microorganismos
3	Conlac	2 B 12	<u>Klebsiella sp</u>
4	"	"	<u>Enterobacter sp</u>
6	"	"	<u>Enterobacter sp</u>
12	"	"	<u>Escherichia coli</u>

Número de Muestra	Marca	Lote	Microorganismos
1	Enfalac	CDM 66	<u>Klebsiella sp</u>
3	"	"	<u>Escherichia coli</u>
6	"	"	<u>Enterobacter aerogenes</u> <u>Klebsiella sp</u>

CAPITULO IV
ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar -- que en todas las muestras analizadas de las leches en polvo des-- tinadas al consumo de lactantes, tales como Nan, Conlac, Enfa-- lac, Plenilac, Nestógeno, Nésbrun, Pelargon, V Modificada en Pro-- teínas y el alimento proteico no lácteo Sobee, se encuentran -- cuentas de: coliformes, mesófilos aerobios, Staphylococcus au-- reus, hongos y levaduras con valores permitidos de acuerdo a lo que señala la Norma Oficial Mexicana, con excepción de dos la-- tas de Enfalac en los que se presentaron valores más altos de -- lo permitido por la norma respecto a la cuenta de hongos. No -- obstante de que casi todas las marcas cumplen con lo estableci-- do en las normas, unas presentan mejor calidad bacteriológica -- que otras:

Las muestras de Nestógeno y Plenilac son de acuerdo a los -- resultados obtenidos, las que desde el punto de vista bacterio-- lógico, presentan mejor calidad ya que sus cuentas de colifor-- mes, mesófilos aerobios, hongos, levaduras y Staphylococcus au-- reus, son muy bajas o no se encuentra la presencia de tales mi-- croorganismos. En la investigación de Salmonella los resulta-- dos fueron negativos en todas las muestras y no se aisló ningún otro tipo de microorganismos.

La marca Nan también presenta cuentas bajas en general, sin embargo, en las muestras 3 y 7 se encuentran la presencia de Serratia licuefaciens y Klebsiella sp, microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza en agua y suelo y que podrían ser causantes de padecimientos en lactantes bajos de defensas o comprometidos.

Conlac, Sobee, V Modificada en Proteínas, Pelargon y Enfalac presentan cuentas de mesófilos aerobios altas, comparadas con Nestógeno, Plenilac y Nan. En la marca Conlac, las muestras 3,4,6 y 12 contienen Klebsiella sp, Enterobacter sp y Escherichia coli, los tres microorganismos se encuentran integrados en el grupo coliforme; sin embargo, en la cuenta de coliformes no se obtuvo formación de colonias.

Las muestras de Sobee analizadas se habían abierto con anterioridad y se mantuvieron por algún tiempo, antes de efectuarse el análisis, cerradas con la tapa de plástico extra que presentaba la lata. En los resultados obtenidos, se presentan cuentas de mesófilos aerobios con grandes diferencias: En las muestras 4 a las 9, todas pertenecientes a un mismo lote, las cuentas fluctúan entre 100 y 500 mesófilos aerobios/gr. en la muestra 3 de otro lote la cuenta de mesófilos aerobios/gr, también se encuentra dentro de las mencionadas; mientras que las muestras 1 y 2 de un tercer lote tienen valores de 40 y 1200 microorganismos mesófilos aerobios/gr, respectivamente. En casi todas las mues-

tras, a excepción de 1,2 y 3 se encontró la presencia de hongos aunque en un número que no sobrepasa el límite especificado por la norma.

Al hacer la investigación de Salmonella ésta no se encontró, pero se aislaron otros microorganismos pertenecientes al grupo de los coliformes como son: Citrobacter diversus, Escherichia coli, Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes, Klebsiella sp Pero al igual que en Conlac, las cuentas de coliformes resultaron ser cero.

Las variaciones que se presentan en la cuentas y la gran diversidad de microorganismos encontrados en la marca Sobee podrían deberse a la introducción de tales microorganismos en el alimento durante el tiempo que las latas permanecieron abiertas o por manipulación de éstas antes de efectuar el análisis microbiológico.

En la marca V Modificada en Proteínas, en las muestras 1 y 7 se encontró Serratia licuefaciens y Escherichia coli y cuentas con valor de cero microorganismo coliformes/gr.

En la muestra de Pelarqón (solo se analizó una lata) se obtuvo la cuenta de mesófilos aerobios más alta de las 100 muestras analizadas, con un valor de 2,200 microorganismos/gr, más sin embargo no se aislaron coliformes. Por ser sólo una muestra la que se analizó, no se pueden comparar los resultados

obtenidos con otras que fueron procesadas bajo las mismas condi
ciones.

Nesbrun tiene cuentas bajas en los análisis realizados, pe-
ro al igual que Pelargón, sólo se analizó una lata, hecho que -
no permite hacer comparaciones ya que como se ha visto en los -
resultados de las marcas anteriores hay muestras que presentan-
ausencia total de microorganismos, mientras que en otras sí hay
presencia, aún siendo del mismo lote.

Se identificó la presencia de un bacilo Gram - positivo en-
el medio de Baird Parker, del cual sólo se encontró una colonia.
De acuerdo a sus características bioquímicas y comparadas en ta-
blas se trata de Bacillus alvei, el cual no es un microorganis-
mo, que se encuentre en la leche, aquí el más frecuente de en-
contrar entre los bacilos esporulados aerobios y facultativos -
es Bacillus cereus.

CAPITULO V
CONCLUSIONES

En general, las muestras analizadas presentan una buena calidad microbiológica ya que presentan cuentas cuyos valores se encuentran dentro de lo permitido por la Norma Oficial Mexicana.

Se puede decir que en algunos casos, no existe correlación entre la cuenta de coliformes y los coliformes presentes, ya que en leches cuya cuenta fue de cero coliformes por gramo, se pudieron aislar microorganismos tales como Escherichia coli, Klebsiella, Citrobacter o Enterobacter, que son indicativos de prácticas sanitarias objetables en el manejo o fabricación de leches en polvo, probablemente por las siguientes fallas:

- Proceso inadecuado de pasteurización, ya que éste destruye los organismos coliformes por tratarse de bacterias no termodúricas. Es esta incapacidad de los coliformes a no sobrevivir a los procesos de pasteurización, lo que constituye una de las bases para su empleo como indicador de prácticas higiénicas deficientes en este alimento.
- Contaminación post-pasteurización por presencia de moscas, equipo mal saneado, materias primas diversas, y aún la tierra y el polvo, sin previo contacto con la materia-

fecal, pueden aportar organismos coliformes al alimento -- por procesar o en proceso.

- Manipulación antihigiénica por parte de los empleados -- que pudieran ser portadores de estos microorganismos.
- Control inadecuado del saneamiento de una planta, pues -- en tales condiciones se podrían introducir diversos mi-- croorganismos en el equipo y una vez introducidos, po-- drían multiplicarse e inocular el producto.

Algunas muestras analizadas presentan una cuenta de hongos -- que excede a lo permitido por la Norma Oficial, su presencia -- puede ser indicativa de prácticas higiénicas defectuosas duran-- te la obtención o almacenamiento del producto. La contamina-- ción no se presentó en todas las muestras del mismo lote tal -- vez porque la distribución de los microorganismos en los alimen-- tos y en particular en los alimentos deshidratados como leches-- en polvo, es a menudo muy heterogénea y los microorganismos pue-- den estar concentrados en ciertas partes, por ejemplo principio, mitad o final de la producción y estar ausentes en otras.

En algunas otras muestras en que se aisló un microorganismo -- que se identificó como Escherichia coli en base a sus caracte-- rísticas bioquímicas, comparando los resultados obtenidos en -- las tablas adecuadas, no podemos asegurar que realmente sea és--

te el causante de los cuadros diarreicos que se pueden presentar en los lactantes alimentados con fórmulas lácteas, debido a que no se llegó a una identificación completa con los sueros-polivalentes y monovalentes.

En ninguna de las muestras analizadas se aislaron ni Salmonella sp, ni Staphylococcus aureus

Lo más probable es que el procesamiento de las leches en polvo sea llevado a cabo en buenas condiciones y que los brotes diarreicos en lactantes se deban a contaminaciones en el momento de la preparación de los biberones en las instituciones o en el hogar.

ANEXO

C. Reactivos

Solución estéril de Ac. Tartárico al 10%.

Ac. Tartárico	10 g
Agua destilada	100 ml

Disolver y esterilizar a 121°C durante 15 minutos

Solución Yodo - Yoduro

Cristales de Yodo	6.0 g
Yoduro de Potasio	6.0 g
Agua destilada	20 ml

Conservar en frasco ámbar.

Solución Verde Brillante al 0.1%

Verde Brillante	0.1 g
Agua destilada estéril	100 ml

Solución de Cloruro de Trifenil Tetrazolio al 1.0%

Cloruro de Trifenil Tetrazolio	1.0 g
Agua destilada	100 ml

Disolver y esterilizar por filtración en membrana.

Solución estéril de Hidróxido de Sodio 1.0 N

Hidróxido de Sodio	40 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Solución de Hidróxido de Sodio 0.1 N

Hidróxido de Sodio	4.0 g
Agua destilada	1000 ml

Solución de Cristal Violeta al 0.1%

Cristal Violeta	0.1 g
Agua destilada	100 ml

Solución Reguladora Diluyente

A. Solución Madre

Fosfato monopotásico	34.0 g
Agua destilada	500.0 ml

Disolver y ajustar el pH a 7.2 con NaOH 0.1N y completar a un litro con agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 min y conservar en refrigeración.

B. Líquido diluyente:

Diluir 1.25 ml de la solución madre en un litro de agua destilada. Distribuir en tubos o frascos y esterilizar a 121°C durante 20 minutos.

Solución estéril de Telurito de Potasio al 1%

Telurito de Potasio	1.0 g
Agua destilada	100 ml

Disolver y esterilizar por filtración en membrana.

Solución estéril de Cloruro de Sodio al 0.85%

Cloruro de Sodio	0.85 g
Agua destilada	100 ml

Disolver y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Rojo de Metilo

Rojo de metilo	0.1 g
Alcohol etílico	300.0 ml

Disolver el indicador en el alcohol y adicionar el agua.

Reactivo de Kovac

P- dimetilamino benzaldehido	5.0 g
------------------------------	-------

Alcohol amílico	75.0 ml
Acido clorhídrico concentrado	25.0 ml

Disolver el aldehído en el alcohol y adicionar lentamente - el HCl.

Solución de Alfa Naftol

Alfa Naftol	5.0 g
Alcohol etílico absoluto	100.0 ml

Solución de Hidróxido de Potasio

Hidróxido de potasio	40.0 g
Agua Suficiente para	100.0 ml

Cristal Violeta (Coloración de Gram)

Disolver 2 g de cristal violeta (85-90%) en 20 ml de alcohol etílico al 95%.

Mezclar con una solución que contenga 0.8 g de oxalato de amonio en 80 ml de agua destilada. Dejar reposar 24 hrs y filtrar por papel.

Lugol (Coloración de Gram)

Yodo	1.0 g
------	-------

Yoduro de Potasio	2.0 g
Agua destilada	300.0 ml

Safranina (Coloración de Gram)

Safranina al 90%	2.5 g
Alcohol etílico al 95%	100.0 ml
Agua destilada	90.0 ml

Disolver el colorante en el alcohol y adicionar el agua.

Solución Yodo - Yodurada

Yodo en cristales	6 g
Yoduro de Potasio	5 g
Agua destilada	20 ml

Indicador Azul de timol

Azul de timol	0.32 g
Hidróxido de sodio 1.0N	6.88 ml
Agua destilada	20.0 ml

Alcohol (Coloración de Gram)

Alcohol etílico al 95%	700.0 ml
Acetona	300.0 ml

D. Medios de CultivoAgar de Bilis y Rojo Violeta

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Extracto de levadura	3.0
Peptona de gelatina	7.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Lactosa	10.0
Cloruro de Sodio	5.0
Agar	15.0
Rojo Neutro	0.03
Cristal Violeta	0.002

pH final 7.4 ± 0.2

Preparación

Suspender 41.5 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto.

Esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Una vez esterilizado enfriar a unos 40° - 45°C, vaciar en cajas de Petri.

Agar Faird - Parker

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona de Caseína	10.0
Extracto de Carne	5.0
Extracto de Levadura	1.0
Cloruro de Litio	5.0
Agar	17.0
Glicina	12.0
Piruvato de Sodio	10.0

pH final 6.8 ± 0.2

Preparación

Suspender 60 g del medio deshidratado en un litro de agua - destilada. Remojar de 5 a 10 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos.

Enfriar a 45° - 50°C y agregar 10 ml de solución de Telurito de Potasio al 1% y 50 ml de emulsión de yema de huevo.

Homogenizar suavemente y vaciar en cajas de Petri.

Refrigerar en recipientes sellados, o en frascos o tubos --

con tapones de rosca cerrados. La base puede conservarse por períodos largos de tiempo. Pueden fundirse y emplearse a medida que se necesite.

Agar Triptona Extracto de Levadura

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona de Caseína	5.0
Extracto de Carne de Res	3.0
Dextrosa	1.0
Agar	15.0

pH final 7.0 ± 0.2

Preparación:

Suspender 24 g del medio deshidratado en un litro de agua - destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C -- (15 lbs de presión) durante 15 minutos.

Una vez esterilizado enfriar a unos 40° - 45°C y vaciar en cajas de Petri.

Agar de Papa y Dextrosa

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Infusión de Papa	200
Dextrosa	20
Agar	15

pH final 5.6 ± 0.2

Preparación:

Suspender 39 g del medio deshidratado en un litro de agua - destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C -- (15 lbs de presión) durante 15 min. Una vez esterilizado enfriar a unos 40° - 45°C y vaciar en cajas de Petri.

Agar Xilosa - Lisina - Desoxicolato

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Xilosa	3.50
L-Lisina	5.0
Lactosa	7.50
Sacarosa	7.50
Cloruro de Sodio	5.0
Extracto de Levadura	3.0
Rojo de fenol	0.08

Agar	13.50
Desoxicolato de Sodio	2.50
Tiosulfato de Sodio	6.80
Citrato de Hierro y Amonio	0.80

pH final 7.4 ±

Preparación:

Suspender 55 g del medio deshidratado en un litro de agua - destilada y dejar que se remoje durante 10 a 15 minutos.

Calentar con todo cuidado y agitando frecuentemente hasta - una temperatura aproximada de 90°C pero sin que el medio llegue a hervir. Dejar de calentar en cuanto se obtenga la disolución completa del polvo. Una vez disuelto, enfriar rápidamente en - agua o en baño María a 50°C y vertir en cajas de Petri. El medio debe ser transparente o casi transparente y tener un color - rojo rubí anaranjado.

El calentamiento excesivo o el mantener el medio demasiado - tiempo en baño maría a 50°C, puede ocasionar que se formen preci - pitados. En este caso se corre el riesgo de que las colonias - sean de menor tamaño y presenten reacciones menos nítidas; sin - embargo, el precipitado no perjudica el desarrollo bacteriano - y puede eliminarse por filtración a través de papel.

Agar Eosina Azul de Metileno

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona de Gelatina	10.000
Lactosa	10.000
Fosfato Dipotásico	2.000
Agar	15.000
Eosina	0.400
Azul de Metileno	0.065

pH final 7.1 ± 0.2

Preparación:

Suspender 37.5 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien hasta obtener una suspensión uniforme. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente.- Hervir durante un minuto. Esterilizar a no más de 121°C (15 - lbs de presión) durante 15 minutos. El agar líquido estéril a 45°C se agita suavemente antes de vaciar en cajas de Petri.

Agar Mac Conkey

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona de gelatina	17.0
Mezcla de Peptonas	3.0
Lactosa	10.0

Mezcla de Sales Biliares	1.5
Cloruro de Sodio	5.0
Agar	13.5
Rojo Neutro	0.03
Cristal Violeta	0.001

pH final 7.1 \pm 0.2

Preparación:

Suspender 50 gramos del medio en un litro de agua destilada o desionizada de buena calidad. Remojar bien entre 10 a 15 minutos y calentar a ebullición agitando continuamente. Hervir durante un minuto: Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs) durante 15 minutos. Enfriar a 45° - 50°C y vaciar en cajas de Petri unos 20 ml. por placa. Dejar solidificar y luego invertir las cajas para evitar que se deposite un exceso de humedad en la superficie del medio.

Agar Kliegler

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Mezcla de peptonas	20.0
Lactosa	10.0
Dextrosa	1.0
Cloruro de Sodio	5.0
Citrato de Amonio Férrico	0.5

Tiosulfato de Sodio	0.5
Agar	15.0
Rojo de Fenol	0.025

pH final 7.4 \pm 0.2

Preparación:

Suspender 52 g del medio deshidratado en un litro de agua -
destilada. Dejar remojar durante 5 a 10 minutos. Mezclar bien
y calentar agitando frecuentemente hasta ebullición. Distri- -
buir volúmenes de 3 ml. en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a
121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Los tubos se de-
ben enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cul-
tivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.5 a - -
2.0 cm.

Agar de Hierro y Triple Azúcar (Agar TSI)

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Mezcla de peptonas	20.0
Cloruro de Sodio	5.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Dextrosa	1.0
Sulfato de Amonio Férrico	0.2

Tiosulfato de Sodio	0.2
Rojo fenol	0.025
Agar	13.0

pH final 7.3 ± 0.2

Preparación:

Suspender 59.4 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Los tubos se deben enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.5 a 2.0 cm.

Agar de Hierro y Lisina

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona de gelatina	5.00
Extracto de levadura	3.00
Dextrosa	1.00
L-Lisina	10.00
Citrato de Amonio Férrico	0.50
Tiosulfato de Sodio	0.04
Púrpura de Bromocresol	0.02

Agar (desechado) 13.50

pH final 6.7 ± 0.2

Preparación:

Suspender 33 g del medio deshidratado en un litro de agua - destilada. Remojar unos 15 minutos. Calentar cuidadosamente, - agitando con frecuencia y hervir durante un minuto, o hasta la disolución completa del agar. Distribuir en tubos con tapa de rosca. Esterilizar a 121°C (12 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada. Cerrar con cuidado las tapas a fin de evitar pérdidas de agua por evaporación.

Agar Citrato de Simmons

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Fosfato Dehidrogenado de Amonio	1.00
Fosfato Dipotásico	1.00
Cloruro de Sodio	5.00
Citrato de Sodio	2.00
Sulfato de Magnesio	0.20
Agar	15.00
Azul de Bromotimol	0.08

pH final 6.9 ± 0.2

Preparación:

Suspender 24.2 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar remojar durante 5 a 10 minutos. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa-disolución.

Distribuir volúmenes de 3ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Los tu bos se deben enfriar en posición inclinada de manera que el me-dio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de-1.0 a 1.5 cm. Se puede emplear también como medio en placas.

Medio SIM

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona de Caseína	20.0
Peptona de Carne	6.1
Sulfato de Hierro y Amonio	0.2
Tiosulfato de Sodio	0.2
Agar	3.5

pH final 7.3 \pm 0.2

Preparación:

Suspender 30 g del medio deshidratado en un litro de agua -

destilada, agitando frecuentemente. Remojar durante 10 minutos y hervir a ebullición durante un minuto. Distribuir en tubos - de ensayo a una altura de unos 4 cm y esterilizar en autoclave - a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos.

Caldo Selenito Cistina

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Triptona	5.0 g
Lactosa	4.0 g
Fosfato disódico	10.0 g
Selenito ácido de Sodio	4.0 g
L- Cistina	0.01 g
Agua destilada	1.000 ml

Preparación:

Disolver 23 g del medio deshidratado en un litro de agua -- destilada, calentar a ebullición durante 10 minutos en un baño - de agua y distribuir en volúmenes de 10 y 125 ml en recipientes según se requiera. Esterilizar a 103 durante 5 minutos.

El pH final debe ser 7.0

Caldo Kauffman

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptosa peptona o triptona	5.0 g
Sales biliares	1.0
Carbonato de Calcio	10.0
Ticsulfato de sodio	30.0

Preparación:

Suspender 46 g del medio deshidratado en un litro de agua - destilada. Mezclar bien y calentar a ebullición. Envasar en - tubos de ensayo en volúmenes de 10 ml cada uno. Guardar en re- frigeración. No esterilizar en autoclave. Momentos antes de - usarlo, agregar 0.2 ml (de 3 a 4 gotas) de la solución yodo yo- durada a cada tubo.

Usar el medio el mismo día en que se le agrega la solución- de yodo.

Caldo Manitol Rojo de Fenol

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona de Caseína	10.0
Cloruro de Sodio	5.0
Manitel	5.0

Rojo de fenol 0.018

pH final 7.4 ± 0.2

Preparación:

Disolver 20 g del medio deshidratado en un litro de agua -- destilada. Esterilizar de 116 a 118°C (no más de 12 lbs de presión) durante 15 minutos. No sobrecalentar.

Caldo Rojo de Metilo - Voges Proskauer

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Mezcla de peptonas	7.0
Dextrosa	5.0
Fosfato de Potasio	5.0

pH final 6.9 ± 0.1

Preparación:

Disolver 17 g del medio deshidratado en un litro de agua -- destilada, mezclar bien. Si es necesario calentar un poco hasta disolución total. Distribuir y esterilizar entre 118°C y 112°C (no más de 15 lbs de presión) durante 15 minutos.

Caldo Sacarosa Urea (Surraco)

Caldo Rojo de Fenol y Sacarosa

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona de caseína	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo Fenol	0.018
Sacarosa	5.0

pH final 7.4

Se disuelven 20 gramos del polvo en un litro de agua destilada y adicionar. 1.0 g de caldo urea por cada 100 ml ó bien -- 1.0 g. de urea sal ó 1 g. de ureasa (que se mantiene en refrigeración) y una gota de indicador azul de timol o azul de bromo-timol. En la esterilización, es muy importante que se sigan -- las siguientes normas: tiempo 10 min, temperatura 110 °C, pre--sión 7 lbs. No deben sobrepasar lo indicado, pues de otra manera el medio se descompone.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

1. Alais, Ch., 1980, Ciencia de la leche: Principios de Técnica lechera.
2. Anonimous, 1976, Breast is best, The Lancet, p.p 412-413.
3. American Academy of Pediatrics, 1978, Breast feeding: A - commentary in celebration of the international year of the child, Pediatrics, 591,62
4. Applebaum, R.M., 1970, The modern manegment of succesfull-breast-feeding, Pediat. Clin. N.A. 17, 203.
5. Buchanan, R.E., N.E. Gibbons, 1974, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
6. Bullen, C., A.T. Willis, 1971, Resistance of the Breast-fed infant to gastroenteritis, Br. Med. J, 3, 338-343.
7. Donowitz, L.G., F. Marsik, K. Fisher, R. Wenzel, 1981, Contaminated Breast Milk: A source of Klebsiella bacteremia - in a newborn intensive care unit, Rev. Inf. Dis, 4, 716-720
8. Donta, S.T., R.B. Wallace, S.S. Whipp et al, 1977, Enterotoxigenic Escherichia coli and diarrheal disease in mexican children, J. Infect. Dis, 135 (3), 482-485.

9. Diagnóstica Merck, Control Microbiológico de productos farmacéuticos y materias primas. Segunda parte.
10. Editorial, 1976, Breast-feeding: the immunological argument, Br. Med. J, 1 (6019), 1167-1168.
11. Editorial, 1975, The importance of breast-feeding S.A. Med. J. 49 (12), 415-416.
12. Evans, D.G., J. Olarte, H.L. Dupont, D.J. Evans, E. Galindo, and R. Conklin, 1977, Enteropathogens associated with pediatric diarrhea in México city, J. Pediatr, 91 (1), 65-68.
13. Fernández, E.E., 1981, Microbiología Sanitaria, 1, 109-832.
14. Fomon, S.J., 1976, Infant Nutrition, 1, 19-357.
15. Frank, S., 1977, Alimentación al seno materno y la salud del lactante, Gaceta Médica del IMSS, 83-85.
16. Gerrard, J.W., 1975, Breast-feeding: Should it be recommended, Can. Med. Assoc. J., 113 (2), 138-139.
17. Goldman, A.S., 1973, Host resistance factors in human milk, J. Pediatr, 82 (6), 1082-1090.
18. Gyorgy, P., 1971, Biochemical Aspects in the uniqueness of human milk, Am. J. Clin. Nutr, 24 (8), 970-975.

- 19 Hanson, L.A., J. Winberg, 1972, Breast milk and defence against infection in the newborn, Arch. Dis. Child, 47, 845
- 20 Harfouche, J.K., 1970, The importance of breast-feeding, J. Trop. Pediatr, 16, 133-169.
- 21 Hargrove, R.E., F.E. Mc Donough, and R.H. Reamer, 1971, A selective medium and presumptive procedure for detection of Salmonella in dairy products, J. Milk. Food. Technol, 34, 6-11.
- 22 Jelliffe, D.B., P. Jelliffe, 1971, Introduction in the uniqueness of human milk, Am. J. Clin. Nutr, 24 (8), 968-975.
- 23 Luengas, J., S. Flores, S. Esquivel, 1980, Manual de Leches, Servicio de Nutrición, Centro Médico Nacional.
- 24 Marlow and Selew, 1961, Texbook of Pediatrics Nursing.
- 25 Mata, L.J., R.G. Wyatt, 1971, Host resistance to infection in the uniqueness of human milk, Am. J. Clin. Nutr, 24 (8), 976 - 986.
- 26 Mobbs, E.J., 1973, Breast-feeding, rooming in demand feeding - and houses of correction, Med. J. Aust, 2, 339-341.
- 27 Mc Kigney, J., 1971, Economics Aspects in the uniqueness of - human milk, Am. J. Clin. Nutr, 24 (8), 1005-1012.
- 28 Newton, M., 1971, Mammary effects in the uniqueness of human - milk, Am. J. Clin. Nutr., 24 (8), 987-990.

29 Norma Oficial Mexicana

- Cuenta de Organismos Coliformes.
- Cuenta de Bacterias Mesofílicas Aerobias.
- Método de Conteo de Hongos y Levaduras en alimentos.
- Determinación de cuenta de Staphylococcus aureus, coagulasa-positivo, en alimentos.
- Método general de investigación de Salmonella en alimentos.

30 Ojofeitimi, E.O., I.A. Elegbe, 1982, The effect of early initiation of calostrum feeding on proliferation of intestinal bacteria in neonates, Clin. Pediatr, 21 (1), 39-42

31 Oseid B.J., 1977, Breast feeding and infant health, Clin. Obstet. Gynecol. 18 (12), 149-173

32 Pickering, L.K., D.J. Evans, O. Muñoz, H.L" Du Pont, et al, 1978, Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and México, J. Pediatr, 93 (3), 383-388.

33 Ramos, G.R., 1961, Seminario sobre la alimentación normal del niño, 1-159.

34 Ray, B., Jezeski, J.J. y Busta, 1971, Isolation of salmonellae from naturally contaminated dried milk products. I. Influence of sampling procedure on the isolation of salmonellae, J. Milk. Food Technol, 34, 389-393.

- 35 Richardson, J.L., 1975, Review of International Legislation - establishing nursing breaks, *J. Trop. Pediatr*, 21 (5), 249-258
- 36 Rohde, P., Manual de Procedimientos de laboratorio y de productos BBL, 5a. edición.
- 37 Rodríguez, R.M. Salas, 1975, Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente pediátrico.
- 38 Thompson, M., 1971, The convenience of breast - feeding in the uniqueness of human milk, *Am. J. Clin. Nutr*, 24 (8), 991-992.
- 39 Vargas, A., L. Jasso, E. Maldonado, F. Resano, 1979, Riesgo - de adquisición de Escherichia coli enteropatógena y su relación con la diarrea del recién nacido, *Sal. Púb. Méx.*, XXI, -- 181-185.
- 40 Woscoboinik, J., 1972, Psicoprofilaxis de la lactancia materna. Biblioteca de Psicología y Sociología aplicadas Paidós, Editorial Paidós, Buenos Aires.