

TEMA 2

HIGIENE, INSPECCIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LA LECHE

- Introducción
- Control higiénico del ganado
- Control higiénico en el ordeño
- Refrigeración de la leche
- Transporte de la leche
- Control de calidad mediante técnicas de laboratorio
- Composición físico-química de la leche.
 - Determinación del extracto seco, humedad y ESM.
 - Determinación del contenido en proteínas (método Sorensen-Walker).
 - Determinación de grasa en leche (método Gerber).
 - Determinación de acidez de la leche.
 - Determinación del cloruro sódico en la leche.
 - Densidad de la leche.
- Calidad higiénica de la leche:
 - Prueba de la reductasimetría en leche.
 - Prueba del alcohol.
- Determinación del grado de calentamiento de la leche.
 - Prueba de la fosfatasa alcalina (prueba de Aschaffenburg y Muellen)
 - Determinación de la actividad peroxidasa (prueba de Storchs)
- Adulteraciones y fraudes
 - Determinación de Antibióticos en leche



INTRODUCCIÓN

Se entiende por leche natural el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras de mamíferos domésticos, sanas y bien alimentadas. Incluye única y exclusivamente la leche natural de vaca, ya que las leches producidas por otras hembras de animales domésticos se designarán indicando el nombre de la especie correspondiente: leche de oveja, leche de cabra, leche de burra, leche de yegua y leche de camella.

La leche constituye un alimento fundamental y básico en la alimentación humana en las primeras etapas de la vida. El hombre es el único mamífero que consume leche a lo largo de toda la vida como tal, o bien transformada en los diferentes productos lácteos como las leches enriquecidas, evaporada, concentrada, en polvo, condensada, o bien productos fermentados como el yogur, leches fermentadas, quesos y la mantequilla.

Ya que la leche sufre diferentes transformaciones industriales para su venta al consumidor como leche tratada térmicamente (pasterizada, esterilizada o UHT) o bien para la elaboración de productos lácteos, el control de calidad desde su origen es fundamental para obtener productos que cumplan las exigencias legales de calidad y que satisfagan las expectativas de los consumidores desde el punto de vista bromatológico.

Los criterios y requisitos relativos a la manipulación higiénica e inspección de la leche y derivados lácteos con el objetivo de garantizar la seguridad alimentaria, por los productores del sector primario así como a las industrias de transformación, quedan recogidos en los Reglamentos 853/2004 y 854/2004, *por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal* y *por el que se establecen las normas específicas para la organización de los controles oficiales de los productos de origen animal*, respectivamente.

En el presente tema se realiza una recopilación de los principales procedimientos a tener en cuenta en el control de calidad de la leche en origen, en el laboratorio antes de llevar a cabo la transformación y con posterioridad a los procesos de tratamiento térmico para comprobar la eficacia de los mismos.

CONTROL HIGIÉNICO DEL GANADO

La leche de vaca debe proceder de una cabaña de animales indemne de tuberculosis y de brucelosis, que no tengan síntomas de enfermedad transmisible al hombre y que produzcan al menos dos litros de leche diarios. Además deben de cumplir los siguientes requisitos sanitarios:

- No presenten síntomas de enfermedad general y del aparato genital o de las ubres.
- No presentar heridas en las ubres que puedan alterar la calidad de la leche
- No haber sido tratadas con sustancias extrañas que puedan transmitirse a la leche, al menos que hayan estado sujetas a un periodo de supresión establecido.



CONTROL HIGIÉNICO EN EL ORDEÑO

La calidad de la leche se debe controlar en origen y a lo largo de todo el proceso de comercialización e industrialización. La leche cruda es obtenida de los rebaños sanos a partir del ordeño mecánico. El ordeño se realiza dos o tres veces al día y hay que seguir unas pautas establecidas para asegurar la higiene de la leche y evitar contaminaciones en el momento de la obtención, tal y como se describe a continuación:

- Lavar y secar el pezón y las zonas limítrofes o limpiar con un paño seco, antes de poner las pezoneras.
- Eliminar los primeros chorros de leche.

- Realizar el ordeño mecánicamente.
- Los manipuladores han de cumplir el código de buenas prácticas higiénicas.
- El aire del establo o sala de ordeño debe ser adecuado.
- Se utilizará agua potable.
- Limpieza y desinfección de los utensilios empleados para el ordeño, de las instalaciones de ordeño mecánico y los recipientes que hayan estado en contacto con la leche. Para ello se recomienda lavar las piezas de goma, después de haberlas mantenido a remojo, con una solución de hidróxido sódico al 0.5%.

Antes del ordeño se puede realizar una de las denominadas pruebas de establo, que son aquellas técnicas analíticas que van en caminadas a detectar posibles alteraciones patológicas de la leche por mamitis. Para ello existen test rápidos de diagnósticos que determinar la calidad higiénica y el número de células somáticas lo que permite descartar la leche en el momento de la recogida, antes de mezclarlas con otras partidas de leche, en los tanques de refrigeración (por ejemplo el California Mamitis Test, más información en <http://www.uwex.edu/milkquality/PDF/CMT%20spanish.pdf>)

REFRIGERACIÓN DE LA LECHE

Una vez que la leche es ordeñada se almacena en los tanques de refrigeración, y debe mantenerse a una temperatura inferior a 8°C si va a ser recogida en el día o a 6°C si va a ser recogida al día siguiente, con el objetivo de evitar la multiplicación de microorganismos mesófilos acidificantes (bacterias lácticas). En esta etapa la higiene del tanque es muy importante para evitar la presencia de microorganismos psicrófilos que crecen a temperaturas de refrigeración y pueden multiplicarse en el tanque de almacenamiento antes de su procesado. Estos microorganismos tienen una actividad lipolítica (bacterias propiónicas y butíricas) y proteolítica (bacterias proteolíticas tipo *Pseudomonas*)

Los tanques de refrigeración suelen estar provistos de sistemas de agitación que favorece la homogeneización de la leche y una mejor refrigeración de la misma. El tanque refrigerante puede ser también una fuente de contaminación importante, y para tratar de minimizarla hay que utilizar equipos con un diseño correcto que se puedan limpiar y desinfectar eficazmente.

TRANSPORTE DE LA LECHE

Posteriormente la leche será recogida y transportada hacia las industrias. Durante este proceso la temperatura de la leche no debe ser superior a los 10°C. El transporte puede efectuarse en vehículos equipados con cisterna que pueden ser o no isotermas, pero en cualquiera de los casos el transporte nos debe asegurar que la temperatura de la leche no sobrepase los 10°C. Los recipientes y las cisternas que se hayan empleado para el transporte de la leche cruda deberán limpiarse y desinfectarse antes de volver a utilizarse.



CONTROL DE CALIDAD MEDIANTE TÉCNICAS DE LABORATORIO

Una vez que la leche es recibida en la planta de transformación, la calidad de la misma puede ser valorada de forma rápida por diversos métodos. Todos estos métodos analíticos tienden a determinar en pocos minutos la calidad de la leche de acuerdo a su composición química, sus características físico-químicas y la calidad higiénica y microbiológica, con el objetivo de agilizar el procesado tecnológico eliminando aquellas leches que no sean aptas para el tratamiento térmico.

Algunas de estas características son de gran importancia, como en el caso del contenido de grasa y proteínas, y la cantidad de células somáticas y microorganismos mesófilos totales, ya que de acuerdo a estos criterios se realiza el pago de la leche al ganadero. Otros

parámetros físico-químicos como la acidez y cloruro sódico nos indican la calidad de la leche, siendo indicadores de la actividad microbiológica y del desequilibrio hidrosalino de la leche, respectivamente.

Cuando se producen cambios en el pH de la leche por crecimiento de los microorganismos mesófilos, o cuando la leche está alterada porque procede de animales enfermos, se producen cambios en la estabilidad de la leche. Por ello, otra de las pruebas que se realizan en el momento de la recepción en la industria lechera, es la determinación de la estabilidad térmica de la leche a los tratamientos térmico, mediante la prueba del alcohol. Cuando la muestra se coagula por la adición de alcohol, nos determina que la leche no es normal, y tiene alteradas sus características químicas y físicas por lo que no puede ser sometida a tratamiento térmico para elaborar una leche tratada.

Además de las determinaciones físicas, químicas y microbiológicas se deben realizar otras determinaciones para conocer la efectividad de los tratamientos térmicos de pasteurización, de acuerdo a la inactivación de determinadas enzimas que de forma natural aparecen en la leche, estudiar el efecto del almacenamiento y tratamiento sobre el grado de oxidación de la grasa, e investigar la posible presencia de sustancias extrañas adicionadas a la leche de forma fraudulenta, o bien presentes en la misma debido a su utilización en terapéutica veterinaria, como es el caso de la presencia de sustancias farmacológicas de actividad antimicrobiana.

Los procedimientos de control de calidad que se realizarán a la leche en el laboratorio, como parte del trabajo práctico de esta asignatura, los hemos agrupado en tres bloques:

- Composición físico-química de la leche
- Calidad higiénica de la leche.
- Determinación del grado de calentamiento de la leche.
- Determinación de adulteraciones y fraudes



COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y CALIDAD HIGIÉNICA DE LA LECHE.

La leche constituye la secreción de la glándula mamaria y químicamente es un alimento líquido con grasa emulsionada, dentro de la estructura del glóbulo graso y proteínas en forma micelar. Por ello podemos decir que la leche es una emulsión de materia grasa en forma globular, en un líquido con unas características similares al plasma sanguíneo. Este líquido es a su vez, una suspensión de materias proteicas en un suero constituido principalmente por lactosa, sales minerales, vitaminas y ácidos orgánicos. La composición química de la leche nos determina la autenticidad de la leche natural y de las leches procesadas industrialmente, como la higienizada o pasteurizada y las tratadas térmicamente (esterilizada y UHT). Además, determinadas situaciones fisiológicas y patológicas de los animales, así como contaminación primaria y secundaria de la leche, producen modificaciones en su composición química, dando lugar a leches anormales con alteraciones en el contenido de proteínas, cloruro sódico y ácido láctico. Por lo que la determinación de variaciones en los parámetros químicos de la leche pueden estar también relacionados con alteraciones en la calidad sanitaria de la leche.

Las características químicas, expresadas en porcentaje de peso, que debe cumplir la leche clasificada de acuerdo a su contenido en materia grasa se resumen en la tabla que se muestra a continuación:

Tipo de leche	Grasa	Lactosa	Proteína	Ceniza	ESM	Acidez
Natural y Entera	3.5	4.2	3.2	0.64	8.2	0.2
Desnatada	<0.3	4.2	3.2	0.64	-	0.19
Semidesnatada	1.5	4.2	3.2	0.64	-	0.19

Esta composición química característica determina la distintas constantes físico-químicas de la leche como son: la densidad, pH, punto crioscópico, punto de ebullición y conductividad eléctrica, las cuales son de interés para determinar la calidad y autenticidad de la misma, ya que por factores dependientes del animal o bien por factores derivados del manejo y acciones fraudulentas (p.e. el aguado, adición de suero lácteos, modificación de la grasa, etc...), provocan alteraciones de la leche que conllevan a una modificación de estas constantes.

Los valores de las principales propiedades físico-químicas de la leche natural se muestran en el siguiente cuadro:

<i>Densidad</i>	1.028 – 1.035
pH	6.4 – 6.8
Punto crioscópico	– 0.52 / – 0.54°C
Punto de ebullición	100.5°C
Conductividad eléctrica	0.005 ohm ⁻¹

OBJETIVOS:

- Conocer los parámetros físico-químicos que definen la calidad de la leche.
- Aplicar los métodos de análisis para la determinación de los principales parámetros químicos y físicos de calidad de la leche natural.

En esta sesión práctica el alumno tendrá que evaluar las muestras de leche que les proporcione el profesor de prácticas y aplicar las técnicas que se describen a continuación.

DETERMINACION DEL EXTRACTO SECO, HUMEDAD Y EXTRACTO SECO MAGRO EN LECHE

Fundamento

Se entiende por contenido en extracto seco de las leches natural, certificada, higienizada y esterilizada, el residuo expresado en porcentaje de peso, obtenido después de efectuada la desecación de la leche hasta peso constante en estufa a temperatura constante de acuerdo al procedimiento descrito en la norma FIL-21:1962 de la Federación Internacional de Lechería.

Material

- Balanza analítica, sensibilidad de 0.1 mg.
- Desecador provisto de gel de silice o algún otro desecante.
- Estufa de desecación que permita obtener una temperatura constante a $102^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Cápsula de desecación de aluminio para la determinación de humedad (también se pueden utilizar placas de Petri).
- Baño termostático.

Procedimiento

- Antes del análisis, poner la muestra en un baño termostático a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y homogenizar. Si la grasa no se homogeniza bien llevar hasta una temperatura de 40°C , mezclar suavemente y enfriar a 20°C antes de la determinación.
- Secar la cápsula junto con la tapadera a $102^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 min.
- Enfriar en el desecador y apuntar el peso.
- Pesar inmediatamente 3 mL de leche anotar exactamente el peso de la muestra.
- Introducir la cápsula en la estufa a $102^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, de jando ladeada la tapadera y mantenerla hasta peso constante.
- Transcurrido el tiempo dejar enfriar la placa en el desecador y pesar.
- Asegurar que ha llegado la muestra a peso constante manteniéndola, tras una primera pesada, durante media hora más en la estufa. Repetir la desecación hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas no sea mayor de 0.5 mg.

Cálculo

El cálculo del extracto seco se realizará de acuerdo a la siguiente ecuación, donde P_{final} es el peso de la cápsula más la muestra una vez completada la desecación y $P_{inicial}$ es el peso de la cápsula más la muestra sin desecar.

$$\text{Extracto seco (\%)} = \frac{P_{final}}{P_{inicial}} \times 100$$

El contenido de humedad, se calcula mediante la diferencia entre 100 y el valor de extracto seco obtenido en cada muestra. El contenido en extracto seco magro (ESM) se calcula mediante la diferencia entre el porcentaje de extracto seco y el porcentaje de grasa determinado en esa misma muestra de leche, y en el caso de la leche entera los valores de ESM deben estar por encima de 8.2%.

DETERMINACION DEL CONTENIDO EN PROTEINAS (Método Sorensen-Walker)

Fundamento

Está técnica determina el contenido en proteínas de la leche mediante una valoración ácido-base, ya que tras la adición de formol a la muestra, el formaldehído se une a los grupos amino de los aminoácidos de las proteínas dejando los grupos carboxilos libres. Este hecho produce cambios en la acidez titulable de la leche siendo valorada con hidróxido sódico. La cantidad de hidróxido sódico utilizado en la neutralización es utilizado para calcular la cantidad de proteínas presente en la muestra.

Material

- Bureta graduada en 0.1 mL.
- Matraz erlenmeyer de 100 mL.
- Pipetas de 10 mL y 5 mL.

Reactivos

- Solución de hidróxido sódico (0.1N).
- Solución comercial de formol (40%).
- Indicador: solución de fenoltaleína al 1 %.

Procedimiento

- Tomar 10 mL de leche problema en un matraz erlenmeyer.
- Añadir 20 mL de agua destilada y adicionar unas gotas de fenoltaleína.
- Neutralizar la acidez titulable natural de la leche con la solución de hidróxido sódico hasta la aparición de un color rosa.
- Añadir posteriormente a la leche neutralizada 2 o 3 mL de formol para dejar libres los grupos carboxilos de los aminoácidos. Tras la adición del formol la muestra se vuelve a acidificar y se muestra nuevamente de color blanco.
- Añadir unas gotas de fenoltaleína y valorar la acidez con hidróxido sódico, hasta la aparición nuevamente del color rosa.



Cálculo

La cantidad de hidróxido sódico 0.1N gastados en la segunda valoración se multiplican por 2.24, y el resultado se expresa como porcentaje de proteínas. El contenido de caseína en la leche lo podemos calcular a partir de una regla de tres, teniendo en cuenta que la cantidad de caseína en la leche de vaca es aproximadamente del 78.5 %.

DETERMINACION DE GRASA EN LECHE (Método Gerber)

Fundamento

El método de Gerber para la determinación de la grasa de la leche, está basado en la utilización de dos reactivos y de la fuerza centrífuga. Por una parte el ácido sulfúrico destruye el estado globular de la grasa y disuelve la caseína de la leche y por otra, la fuerza centrífuga separa la grasa, facilitando dicha separación el alcohol isoamílico, al disminuir la tensión en la interfase entre la grasa y la mezcla ácido-leche. La grasa se determina volumétricamente por la escala del vástago graduado del butirómetro, lectura que directamente expresa el porcentaje en grasa que tiene la leche.

Material

- Pipetas aforadas de 11 mL (pipetas Gerber).
- Baño termostático.
- Centrífuga de Gerber.
- Butirómetro original Gerber y tapones de caucho.

Reactivos

- Acido Sulfúrico: Densidad a 20°C de 1.815 (peso específico a 15.5°C=1.820).
- Alcohol Isoamílico: Peso específico de 0.814-0.816, a 15°C. Químicamente puro, casi incoloro y libre de agua, ácidos, grasas y furfural.

Procedimiento

- Verter 10 mL de ácido sulfúrico en el butirómetro. No mojar el cuello del butirómetro con el ácido.
- La muestra de la leche debe ser homogénea y estar a 20°C. Para ello calentar ligeramente si es necesario e invertir repetidamente el recipiente para favorecer la homogenización evitando la formación de espuma o el batido de la grasa.
- Tomar con la pipeta 11 mL de leche. Secar el extremo de la pipeta con papel de filtro. Verter la leche en el butirómetro, apoyando la pipeta en la pared del cuello del butirómetro, formando un ángulo de 45° para que caiga suavemente sobre el ácido. No mojar el cuello del butirómetro con la leche.
- Adicionar a continuación 1 mL de alcohol amílico en el butirómetro. No mojar el cuello del butirómetro con el alcohol amílico.
- Colocar el tapón de caucho asegurando que queda bien cerrado el butirómetro.
- Con el tapón hacia arriba, agitar el butirómetro vigorosamente hasta que el coágulo se disuelva completamente. Tener en cuenta que al agitar se produce una reacción exotérmica por lo que se debe proteger el butirómetro con un paño y las manos con guantes de goma. Agitar sin interrupción y sin invertirlo. Después invertirlo por lo menos cuatro veces para homogeneizar el contenido del butirómetro y el contenido del bulbo y vástago graduado.
- Colocar inmediatamente el butirómetro en la centrífuga Gerber a 60°C y centrifugar durante 4 minutos.

- Retirar el butirómetro de la centrífuga y colocarlo, con el tapón hacia abajo en un baño termostático a $65\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos, debiendo quedar todo el contenido del butirómetro sumergido.
- Manteniendo siempre el butirómetro en posición vertical y sin agitarlo, retirarlo del baño. Secarlo rápidamente. Ajustar la columna de grasa hasta que coincida con una marca principal de la columna del butirómetro y realizar la lectura del porcentaje de grasa.



Centrífuga Gerber

Cálculos

Según el valor obtenido en la lectura, que ya viene expresado en porcentaje de grasa.



Nivel de grasa en el butirómetro

DETERMINACION DE ACIDEZ DE LA LECHE

Fundamento

Los valores normales de acidez titulable en leche están comprendidos entre 16^oD y 19^oD (grados Dornic) que expresado en porcentaje del ácido mayoritario serían 0.16-0.19% de ácido láctico. Las alteraciones en la leche durante la síntesis o almacenamiento pueden originar cambios en la acidez. Además, determinadas adulteraciones hacen variar estos valores: el aguado la rebaja, el desnatado y adición de suero no la modifican y la neutralización la rebaja considerablemente. Aunque existen diferentes modos de expresar la acidez la forma más habitual de expresión son los grados Dornic (°D) y el porcentaje de ácido láctico.

Material

- Vaso de precipitado.
- Bureta graduada.
- Pipetas graduadas.

Reactivos

- Solución de hidróxido sódico (0.1 N): disolver 4 g de hidróxido sódico en 500 g de agua destilada y agitar hasta la disolución total. Completar hasta 1000 mL con más agua.
- Solución alcohólica de fenoftaleína al 1-2%.

Procedimiento

- Poner en vaso de precipitados 10 mL de leche.
- Adicionar de 4-5 gotas de fenoftaleína.
- Con ayuda de una bureta añadir gota a gota la solución de NaOH 0.1N hasta que el contenido del vaso quede de color rosado de forma permanente o el pH de la solución sea de 8.1.



Cálculos

Los mL gastados de NaOH 0.1N se multiplican por 9 y se divide por 10; y el cociente expresa la acidez titulable de la leche en D° Dornic.

$$\text{D}^{\circ} \text{Dornic} = 9 \times \text{mL de NaOH gastados} / 10$$

La relación entre los D° Dornic y el contenido de ácido láctico es la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{D}^{\circ} &= 1 \text{ mg de ácido láctico} / 10 \text{ mL} \\ \text{D}^{\circ} &= 0.01\% \text{ de ácido láctico} \end{aligned}$$

Observaciones e Interpretación

La leche fresca tiene normalmente de 16-19 D° Dornic. Una acidez inferior a 16 D° son sospechosas de aguado, neutralización, o de proceder de vacas con mastitis. Valores de acidez superior a 19 D° son imputables a leches de más de 10 horas (ordeño de la noche) y valores superiores a 23 D° corresponden a leches muy ácidas que han perdido la estabilidad térmica por lo que no podrían pasteurizarse y/o esterilizarse, ya que se produciría una coagulación.

Si a la muestra de leche se le ha adicionado dicromato potásico, es preciso tener en cuenta la acidez debida a dicho conservador. En el caso de leches no alteradas se puede considerar que 1 g de dicromato potásico aumenta la acidez en las mismas proporciones que 0.6 g de ácido láctico.

DETERMINACION DEL CLORURO SODICO EN LA LECHE

Fundamento

En la composición salina de la leche, se producen variaciones importantes que contribuyen a explicar las diferencias estacionarias y regionales de las leches. Las leches de principio y final de la lactación contienen menor cantidad de ácido cítrico y de potasio, pero más cloro, sodio, calcio y magnesio que las leches en plena lactación. Además, la composición de la leche de vacas enfermas tiende a parecerse a la de al sangre, por lo que las leches mamíticas son más saladas (mayor contenido en cloro y sodio), debido a las alteraciones en la permeabilidad de los alveolos. El contenido normal de sales en la leche, expresado como porcentaje de cenizas debe ser mayor de 0.64% (con un valor alrededor de 7 g/litro). Del total de sales minerales el cloruro sódico es uno de los componentes mayoritarios con un valor que oscila entre 1.5 y 1.8 g/L (que se corresponde con 1 g de Cl/L y de 0.5 g de Na/L).

Para analizar los cloruros, la muestra, a un pH neutro o ligeramente alcalino, se titula con nitrato de plata (AgNO_3), usando como indicador cromato de potasio (K_2CrO_4). El cloruro de plata AgCl , precipita primero cuantitativamente con los cloruros presentes en la muestra dando lugar a un precipitado blanco. Al terminarse los cloruros el AgNO_3 reacciona con el K_2CrO_4 formando un precipitado rojo ladrillo de Ag_2CrO_4 .

Material

- Vasos de precipitado de 100 mL.
- Bureta graduada y contrastada en divisiones de 0.1 mL.

Reactivos

- Solución de nitrato de plata 0.1 N.
- Solución de dicromato potásico al 5%.

Procedimiento

- En un vaso de precipitado se vierten 10 mL de leche exactamente medidos.
- Añadir 2mL del indicador (solución de dicromato potásico).
- Valorar hasta la coloración anaranjada, con la solución de nitrato de plata 0.1 N.

Cálculos e interpretación

El porcentaje de cloruro sódico en la leche se calcula sustituyendo los mL de nitrato de plata gastados en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Cloruro Sódico} = 0.0585 \times \text{mL AgNO}_3 \text{ gastados}$$

Los valores normales de cloruro sódico son 0.15-0.18%. Si sobrepasa el 0.2% se sospechará de anomalías (mamitis, adición de soluciones preparadas, etc...).

DENSIDAD DE LA LECHE

Fundamento

La densidad es una propiedad física utilizada para comparar las masas de diferentes sustancias o de una misma bajo diferentes condiciones. En la densidad de la leche influyen todos los constituyentes normales, así como todas aquellas sustancias extrañas que se adicionan de forma fraudulenta, tanto sólidos como líquidos. Existen muchas causas que actúan variando la densidad de la leche, como son la composición química, la temperatura de medición, la temperatura de almacenamiento, el tiempo transcurrido desde el ordeño, el ordeño fraccionado, la centrifugación y otras operaciones tecnológicas. Así, la densidad depende no sólo, de la temperatura del momento de la determinación, sino también de las temperaturas anteriores, y además este parámetro adquiere su valor más bajo poco después del ordeño, aumentando después lentamente. Generalmente, el tiempo que tarda en estabilizarse el valor de densidad de la leche depende de la temperatura anterior de almacenamiento. A 15°C tarda de 1 a 2 días, mientras que a 50°C lo suele hacer en seis horas. Este comportamiento recibe el nombre de Fenómeno de Recknagel, y depende de la lenta solidificación de la grasa y de la disminución de la cantidad de agua libre. Por ello la temperatura a que ha estado sometida la muestra de leche influye muy ligeramente en el resultado final.

Para la determinación de la densidad de la leche vamos a utilizar la técnica de lactodensimetría. Los lactodensímetros son aerómetros, cuerpos flotadores de vidrio lastrados en su parte inferior con varilla graduada, y que en ocasiones pueden llevar incorporado un termómetro, permitiendo la lectura paralela de la densidad. Y la temperatura. Cuando el aerómetro se introduce en la leche sufre un impulso hacia arriba igual al peso del

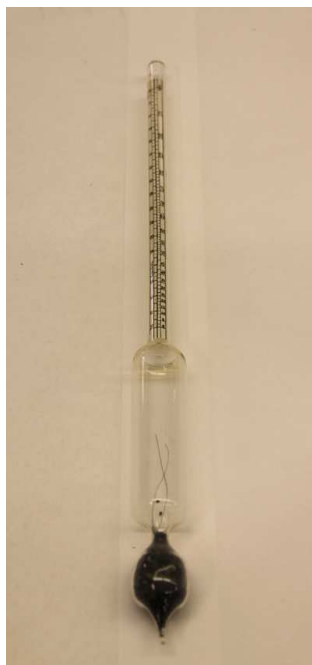
líquido desaloja (principio de Arquímedes), quedando el valor de densidad reflejado en la varilla graduada. La determinación puede realizarse en leche completa o en suero lácteo

En la siguiente tabla se muestra el efecto del ajuste de la temperatura en el valor de densidad de la leche:

Tratamiento	Densidad
Leche mantenida 24 horas a 2°C, calentada a 15°C	1.03236
Leche mantenida 30 segundos a 45°C, enfriada a 15°C	1.03134
Leche mantenida 24 horas a 2°C, calentando a 30°C	1.03008
Leche mantenida 30 segundos a 45°C, enfriada a 30°C	1.02998

Material

- Termolactodensímetro contrastado o lactodensímetro y termómetro.
- Probeta de 250 mL.
- Estufa o baño termostático a 15 o 20° C.



Lactodensímetro

Procedimiento

- Calentar la muestra a la temperatura de 37-40°C y homogeneizarla mediante un agitador en caso de que sea necesario.
- Verter la leche en la probeta e introducir con cuidado el lactodensímetro en la leche manteniendo el aparato en el eje de la probeta y provocar un ligero movimiento de rotación.
- Esperar a que se estabilice y realizar la lectura de la densidad.

Lectura

Efectuar la lectura en la graduación del lactodensímetro. Las cifras descritas se corresponden con las dos últimas cifras de la densidad. Para interpretar los resultados, comprobar la temperatura de la leche, ya que el valor de la densidad que proporciona el lactodensímetro es para una leche con una temperatura de 20°C. Si la temperatura de la leche es diferente, tendremos que aplicar la siguiente corrección. Por cada grado que pase de los 20°C, se suma 0.2 al valor de densidad obtenido, y se resta 0.2 por cada grado que falte para los 20°C.

Observaciones

La densidad varía según el tipo de leche. Para la leche de vaca oscila entre 1.028 y 1.042, siendo el valor medio de 1.031, mientras que el suero de vaca presenta unos valores comprendidos entre 1.027 y 1.030. Para la leche de cabra la densidad es de 1.030-1.034, mientras que en la leche de oveja oscila entre 1.037 y 1.040. Las adulteraciones influyen sobre el valor de la densidad. Así el aguado la rebaja, el desnatado y la adición de leche desnatada la aumentan. Sin embargo la densidad de la leche permanece invariable si la leche es aguada con soluciones preparadas que tengan la misma densidad o es aguada y desnatada al mismo tiempo.

CALIDAD HIGIÉNICA DE LA LECHE

PRUEBA DE LA REDUCTASIMETRIA EN LECHE

Fundamento

La mayoría de los gérmenes de la leche elaboran reductasas que modifican el potencial de óxido-reducción de la misma. Para demostrar ese fenómeno basta añadir a la leche una sustancia que se decolore al pasar de la forma oxidada a la forma reducida. La rapidez con que cambia de color está en función de la población bacteriana y, por ello, puede ser un índice del grado de contaminación de la leche. El colorante más empleado es el azul de metileno, pero también se pueden utilizar la resazurina y el cloruro de 2, 3, 5, trifenil-tetrazolium, ya que son colorantes fácilmente absorbibles por las células vivas.

En general se admite que la decoloración es más rápida cuanto mayor es el número de microorganismos en la leche. Sin embargo, las bacterias presentan distinta habilidad para reducir el azul de metileno, así el *Streptococcus liquefaciens*, los gérmenes del grupo coliaerógenos y los de la putrefacción (*Bacillus subtilis*) se muestran muy activos. Las células somáticas presentes en la leche también influye mucho en la velocidad de decoloración, sobretodo los leucocitos.

Material

- Tubos de ensayo con tapones estériles.
- Baño maría ó estufa a 37°C.
- Pipetas graduadas

Reactivos

- Solución de azul de metileno. Preparar una solución madre diluyendo unos gramos de azul de metileno en alcohol de 96° hasta conseguir la saturación.
- Para preparar la solución de trabajo tomar 2.5 mL de la solución madre y adicionar 97.5 mL de agua destilada estéril.

Procedimiento

- Agitar la leche y agregar 10 mL de leche a un tubo de ensayo.
- Añadirle 0.5 mL azul de metileno, evitar el contacto con la leche.

- Tapar los tubos e introducirlos en baño maría a 37°C.
- Realizar dos ensayos simultáneos para cada muestra.
- Leer los resultados al cabo de 10 minutos y a la hora.



Observaciones e Interpretación

La presencia de microorganismos en la leche y por su acción reductora, se produce una modificación del color del azul de metileno, pasando de color azul intenso a azul claro, pudiendo desaparecer totalmente de acuerdo a la carga microbiana presente. Una leche con un contenido bajo en microorganismos, no modifica el tinte azul del colorante o tarda mucho tiempo en modificarlo. Se considera que en la leche natural fresca el tiempo de decoloración del colorante en la prueba de la reductasimetría debe ser superior a las dos horas, mientras que en la certificada debe ser superior a las cinco horas, dada la mayor calidad higiénica de los productos obtenidos en las granjas diplomadas.



PRUEBA DEL ALCOHOL

Fundamento

Cuando se añade a la leche una cierta cantidad de alcohol etílico se produce una deshidratación, parcial o total, de ciertos coloides hidrófilos, que puede desembocar en su desnaturalización, y con ello a la pérdida de su equilibrio y floculación. Este resultado sólo se alcanza con un cierto grado alcohólico de la mezcla final, por debajo del cual las leches térmicamente estables no floculan, mientras que la leche anormal, esto es la térmicamente inestable, flocula. Todo sucede como si existiera un paralelismo entre la resistencia al calentamiento y la estabilidad en presencia del alcohol. Es posible, por consiguiente, traducir en grado alcohólico la resistencia necesaria a un procedimiento dado de calentamiento. Por lo que todas las leches estables en presencia de esta cantidad de alcohol resistirán el calentamiento correspondiente.

Basándose en este principio se ha ideado un método simple de control o de selección, que consiste en mezclar de golpe volúmenes iguales de leche cruda y de una solución acuosa de alcohol etílico de concentración conocida. La elección de esta última varía según la modalidad de calentamiento (pasterización, esterilización, etc.) a que ha de someterse la leche. La mezcla se agita en frío y se observa, preferentemente después de haberla extendido sobre una superficie de color oscuro o negra. Si no se produce floculación alguna, la leche resistirá perfectamente el calentamiento correspondiente al grado de la solución alcohólica. Si se observa floculación, la leche no se mantendrá estable durante el calentamiento. La concentración de la solución alcohólica, generalmente fijada a 68% cuando se ensayan leches para la pasterización, y debe elevarse hasta 72° o más (a veces hasta 74°) cuando se trata de seleccionar leches para la esterilización. La mayor frecuencia de reacciones positivas con leche normal, excluye el empleo de etanol más concentrado para realizar esta prueba.

Material

- Pipetas de 2 mL y de 5 mL.
- Tubos de ensayo de 10 mL.

Reactivos

- Alcohol de 68° (se prepara llevando 72 mL de alcohol etílico neutralizado de 95° hasta 100 mL con agua destilada).
- Alcohol de 72° (se prepara llevando 76 mL de alcohol etílico neutralizado de 95° hasta 100 mL con agua destilada).

Procedimiento

- Poner en dos tubos de ensayo 2 mL de leche y añadir 4 mL de alcohol a 68° y de alcohol 72°, respectivamente.
- Una vez cerrado invertir varias veces el tubo de ensayo para permitir una buena homogenización de la muestra.

Observaciones e Interpretación

Las leches ácidas inestables en presencia de calor, se coagulan en la prueba del alcohol. Las leches con un equilibrio salino incorrecto o al menos la mayoría de éstas, se coagulan en las mismas condiciones. Conviene sin embargo, subrayar que el paralelismo entre la estabilidad térmica y la inestabilidad en presencia del alcohol sólo se da en el caso de leches cuyo equilibrio salino queda destruido por un exceso de cationes (particularmente leches demasiado ricas en calcio). En cambio, las leches cuya inestabilidad térmica depende de un exceso de aniones se mantienen estables en la prueba del alcohol, pero estas leches son sumamente raras y en la práctica puede utilizarse esta prueba para eliminar aquellas con un equilibrio salino incorrecto. Las leches que contienen un exceso de albúmina por causas fisiológicas (como por ejemplo los calostros) ó patógenas (en el caso de las mastitis), se coagulan siempre cuando se les añade alcohol, incluso cuando su equilibrio ácido-base es normal y cuando no han sufrido fermentación láctea.

Aunque no existe siempre una correspondencia absoluta entre la inestabilidad térmica y la inestabilidad al alcohol (ya que se trata de procesos diferentes), esta prueba permite descubrir una gran mayoría de las leches que no podrían soportar el calentamiento en general ni la esterilización en particular, ya que incluso algunas muestras de leche fresca, normales en todos los aspectos dan a veces un resultado positivo.

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE CALENTAMIENTO DE LA LECHE

Este segundo módulo de prácticas de laboratorio está destinado a completar la inspección y control de la calidad de la leche. Tienen como finalidad determinar el grado de calentamiento de la leche mediante técnicas de laboratorio, por lo que se aplica a leches higienizadas y leches tratadas térmicamente.

El alumno tendrá que evaluar las muestras de leche que les proporcione el profesor de prácticas y aplicar las técnicas que se describen a continuación, para conocer el tratamiento térmico aplicado a cada muestra problema. La determinación del grado de calentamiento tiene un doble interés ya que permite:

- Determinar la efectividad de los tratamientos térmicos utilizados en las industrias de transformación de la leche y obtención de productos lácteos para poder asegurar la calidad sanitaria y vida comercial de los mismos.
- Evitar los fraudes al sustituir una leche cruda por una higienizada

OBJETIVOS

- Conocer la metodología de laboratorio que se pueden aplicar para determinar el grado de calentamiento de la leche.
- Diferenciar entre leche pasteurizada y esterilizada de acuerdo a la inactivación de las enzimas presentes en la misma.

PRUEBA DE LA FOSFATASA ALCALINA (Prueba de Aschaffenburg y Muellen)

Fundamento

La fosfatasa alcalina es una enzima presente en la leche cruda y progresivamente inactivada por calentamiento a temperaturas superiores a 60°C. Las temperaturas normales de pasteurización baja y alta de la leche la inactivan. Por ello debe estar ausente en una leche correctamente pasteurizada. La ausencia de esta enzima termolábil a la salida de la leche del pasteurizador permite asegurar que la pasteurización ha sido efectuada a una temperatura suficientemente alta para asegurar la destrucción de los gérmenes patógenos, normalmente destruidos por la pasteurización. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta enzima se inactiva con la pasteurización baja (tratamiento LTLT, low temperatura long time) y

no con el tratamiento de pasterización alta (HTST, high temperatura short time, min 71.7°C durante 15 seg) que se debe aplicar a la leche pasterizada destinada a consumo humano.

La actividad de la fosfatasa alcalina se determina por la acción hidrolítica de dicho enzima sobre un substrato sintético que da una coloración a la muestra de leche. Se utiliza un kit colorimétrico cualitativo que nos pone en evidencia la presencia de la enzima.

Material

- Tubos de ensayo de 10 mL, gradilla y tapones.
- Pipetas de graduadas.
- Baño maría a 37°C.

Reactivos

- Kit de determinación de Fosfatasa alcalina en leche LACTOGNOST

Procedimiento

- Hervir 5 mL de leche cruda para preparar un control.
- Poner en dos tubos de ensayo P (muestra problema) y C (control) 10 ml de agua destilada y adicionar a cada uno de ello una tableta de Lactognost I y II. Antes de adicionar las tabletas es conveniente machacarlas en un mortero ya que es difícil disolverlas en el agua. Tras adicionar las tabletas remover con una varilla de vidrio para facilitar la disolución.
- Pipetear 1 ml de leche en cada uno de los tubos según corresponda el tipo de muestra e introducir en el baño o estufa a 37°C durante 1 hora.
- Posteriormente añadir a cada tubo una cucharadita del reactivo Lactognost III y homogeneizar.
- Leer el color a los 10 minutos. La existencia de color azul indicará presencia de actividad de la fosfatasa alcalina.



Observaciones e Interpretación

La ausencia de fosfatasa indica claramente una correcta pasteurización baja. La presencia de fosfatasa en una leche que se presupone pasteurizada indica que la leche no ha sido sometida a un tratamiento correcto de pasteurización baja, ó que la leche ó los productos lácteos se hayan contaminado posteriormente con una partida de leche no pasteurizada.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA (Prueba de Storchs)

Fundamento

La actividad de la enzima peroxidasa en la leche se utiliza para el control de la pasteurización. La enzima peroxidasa se mantiene activa tras el proceso de pasteurización baja (LTLT) de la leche, poniéndose en evidencia su actividad por la aparición de un color azul tras la reacción. Sin embargo, cuando el método de pasteurización aplicado a la leche es de mayor temperatura (pasteurización alta, HTST) se destruye la enzima, no apareciendo color en los 30 segundos siguientes al desarrollo de la reacción.

El método es cualitativo y se basa en poner en evidencia la presencia de la enzima mediante el desarrollo de una reacción colorimétrica. La enzima peroxidasa presente en la leche descompone el peróxido de hidrógeno. El oxígeno atómico liberado oxida la 1,4 difenildiamina, incolora, que se convierte en indofenol púrpura, dando una coloración azulada que es proporcional a la concentración de la enzima en la leche.

Materiales

- Tubos de ensayo.
- Pipetas de 5 y 2 mL.

Reactivos

- Solución de 1,4 fenilendiamina: disolver 2 g de fenilendiamina ($C_6H_8N_2$) en agua caliente a $50^{\circ}C$ y diluir hasta 100 mL. Conservar la solución en un frasco de color marrón oscuro con tapón de vidrio y almacenar en un lugar fresco y al abrigo de la luz. Unos o dos días después de la preparación, la solución de 1,4 difenilnamina forma sedimento, por lo que es necesario desecharla.
- Solución de peróxido de hidrógeno: diluir 9 mL de peróxido de hidrógeno al 30% en agua hasta 100 mL. Añadir 1 mL de ácido sulfúrico concentrado por litro de solución, como estabilizador. Esta solución permanece estable durante un mes si se conserva en un lugar fresco y al abrigo de la luz, en un frasco con tapón de vidrio que impida el contacto con compuestos orgánicos.

Procedimiento

- Introducir 5 mL de leche en un tubo de ensayo.
- Añadir 5 mL de la solución de 1,4 fenilendiamina.
- Añadir dos gotas de la solución de peróxido de hidrógeno.
- Observar la coloración dentro de los 30 segundos siguientes.

Interpretación

- Si aparece color azul en los 30 segundos siguientes a la mezcla de los reactivos, la reacción es positiva existiendo actividad peroxidasa en la leche ensayada.
- Si no aparece color la reacción es negativa, lo que nos indicaría que la peroxidasa ha sido inactivada por el calentamiento.
- Si el color azul aparece más de 30 segundos después de la adición de los reactivos a la leche, la reacción no es específica.

DETERMINACIÓN DE ADULTERACIONES Y FRAUDES EN LA LECHE

Este tercer módulo de prácticas de laboratorio está destinado a completar la inspección y control de la calidad de la leche a través de la determinación de adulteraciones y fraudes, analizando las sustancias añadidas de forma fraudulenta a la leche que afectan a la calidad sanitaria y a la calidad general del producto. Hoy en día los controles de calidad en origen y los programas de mejora de calidad higiénica de la leche han disminuido la incidencia de adulteraciones y fraudes en la leche cruda. Una de las fraudes de mayor interés a la hora de investigar sería la detección de antibióticos en leche.

OBJETIVOS

- Conocer la metodología de laboratorio que se pueden aplicar para determinar el la investigación de residuos de antibióticos en leche.
- Interpretar los resultados de acuerdo a la legislación y emitir un dictamen sanitario.

DETECCIÓN SEMICUANTITATIVA DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LECHE

Fundamento

Para el tratamiento de las mamitis y otros procesos infecciosos se administran a los animales un amplio rango de medicamentos con efecto bactericida, como la penicilina G, ampicilina, tetraciclinas y sulfamidas. Estas sustancias antimicrobianas pueden llegar a la leche por los tratamientos que se aplican vía intramamaria, a través de alimentos medicamentosos y por el uso inadecuado de medicamentos administrados intramuscularmente. La presencia de residuos de sustancias antibacterianas en la leche plantea problemas sanitarios por dos razones:

- Por constituir un riesgo sanitario para el consumidor, pudiendo aparecer los siguientes efectos: reacciones alérgicas en personas sensibles, reacciones de carcinogenicidad si la exposición es prolongada, y desarrollo de microorganismos resistentes a los antibióticos.
- Por ser un problema tecnológico al interferir en el crecimiento de los cultivos iniciadores utilizados en la preparación de productos lácteos como el queso y las leches fermentadas.

Para la determinación de antibióticos en leche se utiliza el Kit de detección semicuantitativo basado en técnicas microbiológicas. El principio de esta técnica se basa en añadir una muestra de leche a un agar que contiene un indicador de pH y esporas de *Bacillus steraothermophilus var. cardiolactis*. El medio de cultivo es inicialmente púrpura, y tras el crecimiento de los microorganismos, durante un periodo de incubación y en presencia de la leche, se producen cambios en el medio que van acompañados de la producción de ácido y de una disminución del pH. Como respuesta a este cambio del pH el indicador vira de púrpura a amarillo poniendo en evidencia el crecimiento del microorganismo y la ausencia de sustancias antibacterianas. Si por el contrario el medio se mantiene púrpura tras la incubación, sospecharemos de la presencia de antibióticos que inhibirían el crecimiento de los microorganismos presentes en el agar.

Materiales y Reactivos

- Kit de detección de antibióticos en leche CHR Hansen (500145 Copan Test P&S).

Procedimiento

- Tomar una muestra de leche de un volumen de 100 µl con la pipeta d del kit y adicionar en uno de los tubos preparados para el ensayo. Tener la precaución de utilizar una pipeta nueva para cada muestra.
- Colocar el tubo en una esufa o baño maría s $64\pm 1^{\circ}\text{C}$ e incubar.
- Leer los resultados en el cambio de color del medio de cultivo cuando ha transcurrido el tiempo de incubación (3 horas).
- Las muestras deben ser ensayadas paralelamente con un control positivo constituido por una solución patrón de penicilina con una concentración de 0.004 µg/ml (0.0067 UI/ml), y con otro control negativo que será leche desnatada en polvo sin sustancias antimicrobianas.

Interpretación

El kit semicuantitativo permite detectar la presencia de sustancias antibacterianas en leche cuando se encuentran en concentraciones superiores a los Límites Máximos Residuales (LMR). Para interpretar los resultados obtenidos tendremos en cuenta las variaciones de color de la muestra problema, del control negativo y del control positivo, tal y como se muestra en el siguiente Cuadro.

Control positivo (0.004 µg de penicilina/ml)	Control negativo	Color de la muestra problema	Interpretación
Púrpura	Amarillo	Púrpura	Presencia de sustancias antimicrobianas en la leche por encima de los LMR
Púrpura	Amarillo	Amarillo	Ausencia de sustancias antimicrobianas
Púrpura	Amarillo	Coloración púrpura irregular	Presencia de sustancias antimicrobianas en concentraciones bajas
Púrpura	Púrpura	Púrpura	Ensayo mal realizado por ausencia de esporas viables del <i>Bacillus stearothermophilus var. cardiolactis</i>

En el caso de que la muestra de positiva habría que decomisar la partida de leche y no autorizar su destino para consumo humano, procediendo a completar el análisis con un estudio que nos permita cuantificar e identificar las sustancias antimicrobianas presentes en la leche.

DETERMINACIÓN DE ADULTERACIONES Y FRAUDES EN LA LECHE

Este tercer módulo de prácticas de laboratorio está destinado a completar la inspección y control de la calidad de la leche a través de la determinación de adulteraciones y fraudes, analizando las sustancias añadidas de forma fraudulenta a la leche que afectan a la calidad sanitaria y a la calidad general del producto. Hoy en día los controles de calidad en origen y los programas de mejora de calidad higiénica de la leche han disminuido la incidencia de adulteraciones y fraudes en la leche cruda. Una de las fraudes de mayor interés a la hora de investigar sería la detección de antibióticos en leche.

OBJETIVOS

- Conocer la metodología de laboratorio que se pueden aplicar para determinar el la investigación de residuos de antibióticos en leche.
- Interpretar los resultados de acuerdo a la legislación y emitir un dictamen sanitario.

DETECCIÓN SEMICUANTITATIVA DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LECHE

Fundamento

Para el tratamiento de las mastitis y otros procesos infecciosos se administran a los animales un amplio rango de medicamentos con efecto bactericida, como la penicilina G, ampicilina, tetraciclinas y sulfamidas. Estas sustancias antimicrobianas pueden llegar a la leche por los tratamientos que se aplican vía intramamaria, a través de alimentos medicamentosos y por el uso inadecuado de medicamentos administrados intramuscularmente. La presencia de residuos de sustancias antibacterianas en la leche plantea problemas sanitarios por dos razones:

- Por constituir un riesgo sanitario para el consumidor, pudiendo aparecer los siguientes efectos: reacciones alérgicas en personas sensibles, reacciones de carcinogenicidad si la exposición es prolongada, y desarrollo de microorganismos resistentes a los antibióticos.
- Por ser un problema tecnológico al interferir en el crecimiento de los cultivos iniciadores utilizados en la preparación de productos lácteos como el queso y las leches fermentadas.

Para la determinación de antibióticos en leche se utiliza el Kit de detección semicuantitativo basado en técnicas microbiológicas. El principio de esta técnica se basa en añadir una muestra de leche a un agar que contengan un indicador de pH y esporas de *Bacillus steraothermophilus* var. *cardiolactis*. El medio de cultivo es inicialmente púrpura, y tras el crecimiento de los microorganismos, durante un periodo de incubación y en presencia de la leche, se producen cambios en el medio que van acompañados de la producción de ácido y de una disminución del pH. Como respuesta a este cambio del pH el indicador vira de púrpura a amarillo poniendo en evidencia el crecimiento del microorganismo y la ausencia de sustancias antibacterianas. Si por el contrario el medio se mantiene púrpura tras la incubación, sospecharemos de la presencia de antibióticos que inhibirían el crecimiento de los microorganismos.

Materiales y Reactivos

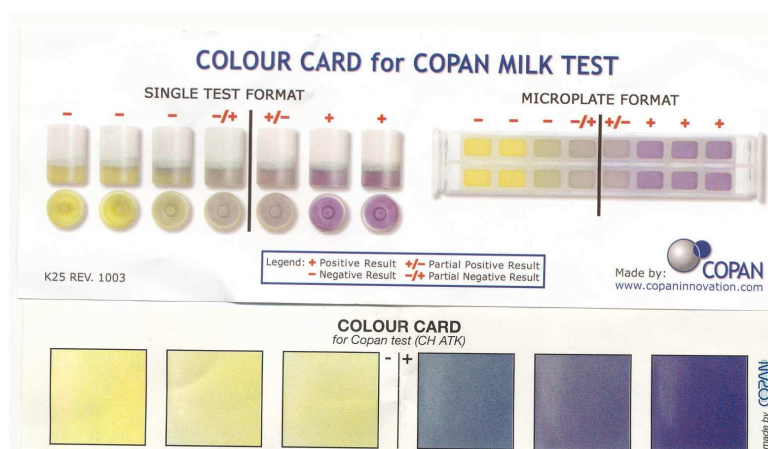
- Kit de detección de antibióticos en leche CHR Hansen (500145 Copan Test P&S)

Procedimiento

- Tomar una muestra de leche de un volumen de 100 µl con la pipeta d del kit y adicionar en uno de los tubos preparados para el ensayo. Tener la precaución de utilizar una pipeta nueva para cada muestra.
- Colocar el tubo en una esufa o baño maría s $64\pm 1^{\circ}\text{C}$ e incubar.
- Leer los resultados en el cambio de color del medio de cultivo cuando ha transcurrido el tiempo de incubación (3 horas).
- Las muestras deben ser ensayadas paralelamente con un control positivo constituido por una solución patrón de penicilina con una concentración de 0.004 µg/ml (0.0067 UI/ml), y con otro control negativo que será leche desnatada en polvo sin sustancias antimicrobianas.

Interpretación

El kit semicuantitativo permite detectar la presencia de sustancias antibacterianas en leche cuando se encuentran en concentraciones superiores a los Límites Máximos Residuales (LMR) de acuerdo a los cambios de color que se observan en el medio de cultivo.



Carta de color para interpretar los resultados del test de antibióticos

Para interpretar los resultados obtenidos tendremos en cuenta las variaciones de color de la muestra problema, del control negativo y del control positivo, tal y como se muestra en el siguiente Cuadro.

Control positivo (0.004 µg de penicilina/ml)	Control negativo	Color de la muestra problema	Interpretación
Púrpura	Amarillo	Púrpura	Presencia de sustancias antimicrobianas en la leche por encima de los LMR
Púrpura	Amarillo	Amarillo	Ausencia de sustancias antimicrobianas
Púrpura	Amarillo	Coloración púrpura irregular	Presencia de sustancias antimicrobianas en concentraciones bajas
Púrpura	Púrpura	Púrpura	Ensayo mal realizado por ausencia de esporas viables del <i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>cardiolactis</i>

Los resultados serán positivos siempre que las sustancias antibacterianas se encuentren por encima de las concentraciones indicadas a continuación:

Sustancia	µg/Kg = ppb
Bencilpenicilina	4
Ampicilina	4
Amoxicilina	4
Oxaciclina	30
Cloxacilina	30
Dicloxacilina	30
Sulfonamidas	100
Trimetoprim	50
Dapsona	25
Tetraciclina	100
Espiramicina	150
Benzimidazol	10
Levamisol	10