

**Control de Calidad Microbiológico**  
**- Prueba Simplificada para la**  
**Detección de Coliformes Totales**



## Origen

Red Brasileña de Bancos de Leche Humana - Instituto Nacional de Salud de la Mujer, del Niño y del Adolescente Fernandes Figueira / Fundación Oswaldo Cruz / Ministerio de Salud

## Autores

João Aprígio Guerra de Almeida  
Franz Reis Novak  
Vander Guimarães

## Correctores

Andreia Fernandes Spinola  
Danielle Aparecida da Silva  
Jonas Borges da Silva  
Maíra Domingues Bernardes Silva  
Mariana Simões Barros  
Miriam Oliveira dos Santos  
Mônica Barros de Pontes

## Diseño Gráfico

Chester Robison Pereira Martins

1ª Publicación: BLH-IFF/NT 40.05:  
Control de Calidad Microbiológica  
- Prueba Simplificada para la Detec-  
ción de Coliformes Totales

1ª Revisión: BLH-IFF/NT 40.11

2ª Revisión: BLH-IFF/NT 40.21

## Palabras clave

Banco de Leche Humana. Leche Hu-  
mana Extraída Pasteurizada. Calidad.  
Microbiología. Coliformes

Red Brasileña de Bancos de Leche Humana  
Programa de Certificación Fiocruz para Bancos de Leche Humana  
Sede: IFF/Fiocruz/Centro Nacional de Referencia de Bancos de Leche Humana.  
Avenida Rui Barbosa 716, 1º piso, Flamengo, Rio de Janeiro - RJ, CP: 22250-020  
Contactos:  
+55 (21) 2554-1703 - Banco de Leche Humana  
+55 (21) 2554-1889 - Secretaría Ejecutiva rBLH  
Correo Electrónico: [rblh@fiocruz.br](mailto:rblh@fiocruz.br) / Portal: [www.rblh.fiocruz.br](http://www.rblh.fiocruz.br)



## SUMARIO

1. *Objetivo*
2. *Documentos Complementarios*
3. *Definición*
4. *Fundamentos*
5. *Condiciones Generales*
6. *Condiciones Específicas*
7. *Referencias Bibliográficas*
8. *Anexos*



## 1. Objetivo

Esta Norma Técnica tiene por objetivo establecer las orientaciones necesarias para determinar la presencia de bacterias coliformes totales en la leche humana pasteurizada, con el fin de garantizar la calidad de los Bancos de Leche Humana y su certificación.

## 2. Documentos Complementarios

Para la elaboración de esta Norma Técnica se han consultado:

RED BRASILEÑA DE BANCOS DE LECHE HUMANA. BLH-IFF/NT 11.21: Higiene y Conducta: Empleados. Río de Janeiro, 2021.

RED BRASILEÑA DE BANCOS DE LECHE HUMANA. BLH-IFF/NT 34.21: Pasteurización de la Leche Humana Extraída. Río de Janeiro, 2021.

RED BRASILEÑA DE BANCOS DE LECHE HUMANA. BLH-IFF/NT 51.21: Bioseguridad en Bancos de Leche Humana y Centros de Recolección de Leche Humana. Río de Janeiro, 2021.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Resolución RDC nº 171, del 04 de septiembre de 2006. Dispone sobre el Reglamento Técnico para el Funcionamiento de los Bancos de Leche Humana. Boletín Oficial de la Unión, Brasilia, DF, 04 de septiembre de 2006.

## 3. Definiciones

3.1. **Ambientación:** espacio organizado arquitectónicamente, un ambiente físico especialmente preparado para la realización de una determinada actividad.

3.2. **Coliformes Termotolerantes:** subgrupo de bacterias del grupo de los coliformes que fermentan la lactosa a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  en 24/48 horas; su principal representante es *Escherichia coli*, de origen fecal.

3.3. **Coliformes Totales (bacterias del grupo coliformes):** bacilos gramnegativos, aeróbicos o anaeróbicos facultativos, no formadores de esporas, oxidasa negativos, capaces de crecer en presencia de sales biliares o tensioactivos, que fermentan la lactosa produciendo ácido, gas y aldehído a  $35,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  en 24/48 horas, y que pueden presentar actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.



## 4. Fundamentos

El control de calidad microbiológico de la leche humana extraída practicado por la Red Brasileña de Bancos de Leche Humana sigue la lógica recomendada para los alimentos, que establece el uso de microorganismos indicadores de calidad sanitaria.

En este contexto, el grupo de los coliformes ha ocupado un lugar destacado, ya que es sencillo de cultivar, económicamente viable y seguro, lo que minimiza la posibilidad de resultados falsos negativos.

Basándose en el procedimiento clásico para la detección de coliformes totales, se desarrolló una metodología alternativa consistente en la inoculación de cuatro alícuotas de 1mL, pipeteadas independientemente, en tubos con 10mL de Caldo Bilis Verde Brillante (BGBL) al 5% p/v, con tubos Durham en su interior.

Tras la inoculación y la incubación a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , la presencia de gas dentro del tubo Durham caracteriza un resultado positivo. El tubo positivo debe repicarse con la ayuda de un asa bacteriológica calibrado de 5mm, es decir, con una capacidad de 10 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) a tubos que contengan BGBL a una concentración de 40g/L.

Tras incubar estos tubos durante el mismo periodo, la presencia de gas confirma la existencia de microorganismos del grupo coliforme, lo que hace que el producto no sea apto para el consumo. Los métodos alternativo y clásico no difieren entre sí, cuando se comparan mediante la prueba de Chi-cuadrado a un nivel de probabilidad del 5%.

## 5. Condiciones Generales

5.1. El Control de Calidad Microbiológico se realizará inmediatamente después del procesamiento de la leche humana extraída.

5.2. Los frascos deberán permanecer en la cadena de frío durante la colecta de muestras para el control de calidad microbiológico.


5.3. Antes de realizar los análisis, el profesional comprobará la caducidad e integridad de los medios de cultivo que se van a utilizar, así como las condiciones del material de vidrio.

## 6. Condiciones Específicas

6.1. Antes de preparar el medio de cultivo, el profesional debe paramentarse de acuerdo con las Normas Técnicas BLH-IFF/NT 11.21: Higiene y Conducta: Empleados y BLH-IFF/NT 51.21: Bioseguridad en Bancos de Leche Humana y Centros de Recolección de Leche Humana.

6.2. Los siguientes materiales son necesarios para realizar el análisis microbiológico:

- a. Pipetas serológicas, esterilizadas, graduadas de 1mL de capacidad o pipeteador automático con punteras descartables de 1mL;
- b. Tubos de Durham;
- c. Tubos indicados para el cultivo microbiológico con una capacidad mínima de 15mL;

- 
- d. Autoclave capaz de funcionar a 121°C durante 15 minutos;
  - e. Estufa bacteriológica para cultivo, regulado a 36°C, con precisión de  $\pm 1^\circ\text{C}$ ;
  - f. Balanza semianalítica con sensibilidad de 0,1g calibrada;
  - g. Asa bacteriológica calibrado a 10 microlitros;
  - h. Mechero Bunsen o campana de flujo laminar;
  - i. Vaso de precipitado para el preparo de medio de cultura;
  - j. Tubo de vidrio con tapa a rosca con capacidad mínima de 15 mL;
  - k. Frasco de Erlenmeyer;
  - l. Estante para Soporte, revestida de PVC;
  - m. Hielo reciclable;
  - n. Cajas isotérmicas, revestidas de PVC.

### 6.3. Materiales y reactivos:

Caldo Bilis Verde Brillante 2% lactosa;  
Agua destilada o desionizada.

### 6.4. Procedimiento:

#### 6.4.1. Preparación de medios de cultivo y reactivos:

##### 6.4.1.1. Preparación del Caldo Bilis Verde Brillante - concentrado (5% p/v):

- a. Pesar 50g de medio de cultivo Caldo Bilis Verde Brillante en la cristalería adecuada utilizando una balanza semianalítica calibrada con sensibilidad de 0,1g;
- b. Medir 1 litro de agua destilada o desionizada en una probeta;
- c. Añadir 200 ml de agua destilada o desionizada para disolver el medio de cultivo. Mezclar con una varilla de vidrio o un agitador magnético en una placa calentada;
- d. Después de la completa disolución del medio de cultivo, poco a poco, añadir el volumen restante de agua destilada o desionizada en el cilindro, continuando la agitación hasta completar el volumen de 1 litro y su completa disolución;
- e. Distribuir 10mL del medio de cultivo preparado en tubos de vidrio con tapas de rosca, indicados para cultivo microbiológico con una capacidad mínima de 15mL, conteniendo ya los tubos Durhan invertidos en su interior.
- f. Identificar el lote de medio producido con el nombre del medio, la concentración y la fecha de preparación.
- g. Cerrar los tubos dejando sus tapas a  $\frac{1}{4}$  de vuelta para su esterilización
- h. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos o a la temperatura recomendada por el fabricante en autoclave;
- i. Al final del proceso de esterilización, espere a que el equipo se enfríe antes de abrir la válvula de escape de aire



y proceda a retirar los tubos con medio de cultivo. Este procedimiento evita la formación de microburbujas en el interior de los tubos Durham;

j. Tras sacar los tubos de la autoclave, ciérrelos, verifique si se han formado microburbujas e identifique los lotes de tubos con el nombre del medio, la concentración y la fecha de caducidad;

k. Proceder a la validación de la prueba de esterilidad, incubando como mínimo 10% del lote de medio de cultivo en una estufa a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. La formación de gas o la turbidez del medio en un solo tubo descalifica todo el lote producido;

l. Después de la prueba de esterilidad, los tubos con el medio de cultivo pueden almacenarse en refrigeración a  $5^{\circ}\text{C}$  durante un máximo de 15 días.

#### 6.4.1.2. Preparación del Caldo Bilis Verde Brillante - simple (el 4% p/v):

a. Pesar 40g del medio de cultivo Caldo Bilis Verde Brillante en la cristalería adecuada utilizando una balanza semianalítica con sensibilidad calibrada de 0,1g;

b. Medir 1 litro de agua destilada o desionizada en una probeta;

c. Añadir 200 ml de agua destilada o desionizada para disolver el medio de cultivo. Mezclar con una varilla de vidrio o un agitador magnético en una placa calentada;

d. Después de la disolución completa del medio de cultivo, poco a poco, añadir el volumen restante de agua destilada o desionizada en la probeta, continuando la agitación hasta que el volumen de 1 litro esté completo y totalmente disuelto;

e. A continuación, distribuya 9mL del medio de cultivo en tubos de vidrio con tapas a rosca, indicados para el cultivo microbiológico con una capacidad mínima de 15mL, y añada los tubos Durham invertidos;

f. Identificar el lote de medio producido con el nombre del medio, la concentración y la fecha de preparación;

g. Cerrar los tubos dejando sus tapas a  $\frac{1}{4}$  de vuelta para su esterilización;

h. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos o a la temperatura recomendada por el fabricante en autoclave;

i. Al final del proceso de esterilización, espere a que el equipamiento se enfríe antes de abrir la válvula de escape de aire y proceda a retirar los tubos con medio de cultivo. Este procedimiento evita la formación de microburbujas en el interior de los tubos Durham;


j. Después de sacar los tubos del interior de la autoclave, cierre los tubos, verifique si hubo formación de microburbujas e identifique los lotes de tubos con el nombre del medio, la concentración y la fecha de vencimiento;

k. Proceder a la validación de la prueba de esterilidad, incubando el lote de medio de cultivo en una incubadora a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24h. La formación de gas o la turbidez del medio en un solo tubo descalifica todo el lote producido;

l. Después de la prueba de esterilidad, los tubos con el medio de cultivo pueden almacenarse en refrigeración a  $5^{\circ}\text{C}$  durante un máximo de 15 días.

#### 6.4.2. Colecta de muestras de leche humana pasteurizada para su análisis e inoculación;

6.4.3. Antes de realizar los análisis, saque los tubos con el medio de cultivo del refrigerador para que se equilibren con la temperatura ambiente;



6.4.4. Asegurarse, antes de su utilización, de que los tubos Durhan están completamente sumergidos en el medio de cultivo y libres de burbujas de aire y de depósitos de cristales en su interior;

6.4.5. Identifique los tubos en función de los frascos a analizar con la ayuda de etiquetas o bolígrafo específico para vidrio;

6.4.6. Tras el tratamiento térmico (pasteurización), todos los frascos deben mantenerse en la cadena de frío hasta la etapa de control de calidad microbiológico;

6.4.7. Recoger cuatro alícuotas de 1 mL de la muestra a analizar. Las muestras deben recolectarse, bajo llama o en una cabina de seguridad biológica, siguiendo el rigor microbiológico;

6.4.8. Las alícuotas deben recogerse en diferentes puntos del frasco;

6.4.9. Depositar todas las alícuotas de la misma muestra en un solo tubo de cultivo que contenga Caldo Bilis Verde Brillante concentrado (BGBL el 5%);

6.4.10. Tapar los tubos que contienen la leche con el medio de cultivo e incubar a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 a 48 horas en estufa;

6.4.11. Las alícuotas de leche humana pasteurizada colectadas no deben congelarse para su posterior análisis.

6.5. Cuidado con la muestra:

6.5.1. Cada tubo que reciba la muestra debe llevar el número del frasco de la que se extrajo la leche. Las muestras se acondicionarán y transportarán al laboratorio con el producto para su análisis en cajas isotérmicas, manteniendo las mismas condiciones de la cadena de frío recomendadas para la Leche Humana Extraída.

6.6. Determinación de los coliformes totales:

6.6.1 La determinación de la presencia o ausencia de coliformes totales se realiza observando la formación de gas en el interior de los tubos Durhan;

6.6.2 Los tubos que contengan burbujas de gas dentro de los tubos Durhan en un período de 24 a 48 horas de incubación a una temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  se consideran positivos para coliformes;

6.6.3. La presencia de gas indica un resultado presuntivo, que debe someterse a una prueba de confirmación.

6.7. Prueba de confirmación:

6.7.1. La prueba de confirmación de la presencia de coliformes debe realizarse seleccionando únicamente los tubos inoculados con muestras de leche humana pasteurizada que hayan dado resultado positivo en la prueba presuntiva;


6.7.2. Antes de iniciar la toma de muestras, el profesional paramentado de acuerdo con la Norma Técnica BLH-IFF/NT 11.21: Higiene y Conducta: Empleados, deben flambear el asa de platino en la llama de un mechero Bunsen o en un esterilizador automático, no siendo necesario cuando se utilizan asas desechables;

6.7.3. Recoger una alícuota de 10 microlitros, con la ayuda de un asa de platino o desechable, bajo campo de llama o cabina de seguridad biológica, de los tubos seleccionados en el punto 6.4.9.:

6.7.3.1. El muestreo consiste en la formación de una membrana a partir del medio de cultivo.

6.7.4. Inocular el asa en medio de cultivo a una concentración del 4% p/v (caldo verde biliar simple);





---

6.7.5. Tapar los tubos que contienen las muestras con el medio de cultivo e incubar a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 a 48 horas en estufa;

6.7.6. La temperatura de la estufa se controlará y registrará, al inicio y al final de un turno de trabajo, con instrumentos adecuados para ello (ver Anexo de esta Norma) y siguiendo la Norma Técnica BLH-IFF/NT 44.21: Control de Termómetros.

## 7. Referencias Bibliográficas

El marco teórico que da soporte técnico y científico a los fundamentos que componen esta Norma fue extraído de las siguientes fuentes:

ALMEIDA, J. A. G., 1986. Qualidade do Leite Humano Coletado e Processado em Bancos de Leite. Dissertação de Mestrado, Viçosa: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

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

## 8. Anexo



**Programa de Certificação Fiocruz em Bancos de Leche Humana para el Sistema Único de Salud(PCFioBLH-SUS)**

**BLH-IFF/PCFioBLH 00012**  
**Formulario para Registro de Resultados de la Detección de Coliformes Totales – Test Simplificado**

Nº del Lote:		Nº del Laudo:	
Nº del Frasco Pasteurizado	Coliforme Total (A=Ausencia/P=Presencia)	Pesquisa	Situación/Consumo (P= Propio/Impropio)

Colecta	Lectura
Fecha: ___ / ___ / ___ Hora: ____ : ____	Fecha: ___ / ___ / ___ Hora: ____ : ____
Responsable: _____	Responsable: _____



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz