

Colegio Oficial de Veterinarios de Barcelona

Sugestiones para el control sanitario de la leche pasteurizada

por

JOSÉ VIDAL MUNNÉ
Veterinario

Trabajo galardonado con el «Premio Farreras»,
en el Concurso organizado en 1947, por el
Colegio Oficial de Veterinarios de Barcelona

BARCELONA

1948

Sugestiones para el control sanitario de la leche pasteurizada

por

JOSÉ VIDAL MUNNÉ
Veterinario

Trabajo galardonado con el «Premio Farreras»,
en el Concurso organizado en 1947, por el
Colegio Oficial de Veterinarios de Barcelona

BARCELONA

1948



JOSÉ FARRERAS SAMPERA

* 1880 - † 1914

José Farreras Sampera

Nació José Farreras en la cercana villa de Masnou el 16 de septiembre de 1880. En 1896 ingresó en la Escuela de Veterinaria de Zaragoza donde cursó toda la carrera con las más altas calificaciones, y la terminó en 1901, cuando apenas contaba 21 años, obteniendo el Premio extraordinario por oposición.

Comenzó a ejercer al lado de su padre, experto profesor veterinario de primera clase, cuya gran experiencia clínica se asimiló bien pronto, y se inició en el cargo de Inspector de carnes desempeñándolo en algunos pueblos inmediatos a su villa natal. Pero, su sólida preparación científica, su amor al estudio, su juventud y su talento le impulsaban hacia más amplios horizontes, y movido por estímulos tan poderosos tomó parte en las oposiciones que en 1909 convocó el Ayuntamiento de Barcelona para proveer dos plazas de Veterinario municipal y, tras reñidos ejercicios, obtuvo el primer lugar.

Ya en la capital, y aprovechando las horas que le dejaba libres su actuación en el Matadero, aprendió bacteriología al lado del maestro Turró, en el Laboratorio Municipal, y en aquella época en que la hipnoterapia estaba en su apogeo tuvo a su cargo, junto con el gran clínico Antonio Darder, la clínica de la Sociedad de seguros de ganados "La Unión Catalana".

Pero, José Farreras, que siempre alcanzó la cima de donde se propuso llegar, quiso ser, y logrólo cumplidamente, publicista profesional. Inspirado en el noble deseo de elevar el nivel científico de la Clase, de dignificarla con el amor al estudio, y de despertar en ella la inquietud y el deseo de saber, fundó, sostuvo y difundió la *Revista Veterinaria de España*, desde cuyas páginas volcó sobre la mentalidad enmohecida de la mayoría de los compañeros de su tiempo toda la ciencia veterinaria de las naciones más cultas de Europa. En esta empresa, en la que también triunfó, hubo de poner una abnegación, una fuerza de voluntad y una perseverancia que difícilmente podrán comprender los veterinarios de hoy, tan distintos en sus matices culturales y en sus aspiraciones ideológicas de los de cuarenta años atrás. Anexo a la *Revista* publicó un "Memorándum para el diagnóstico bacteriológico de las enfermedades de los animales domésticos" que se agotó en seguida, y el "Manual del Veterinario Inspector de Mataderos, Mercados y Vaquerías", que, con el título ligeramente modificado ha ido modernizando Sanz Egaña en ediciones sucesivas.

José Farreras fué un veterinario completo, un compañero leal y entusiasta, un hombre trabajador, modesto y bueno. La brevedad de su existencia impidió que la Clase veterinaria pudiese recoger el fruto sazonado de su talento, extinguido cuando frisaba con la madurez.

Sugestiones para el control sanitario de la leche pasteurizada

JUSTIFICACIÓN

En todos los programas sanitarios se encuentra un capítulo dedicado a la higiene de la leche. ¿Por qué será? La observación fría de las estadísticas de mortalidad, ha puesto, ante los ojos atónitos de los más modestos observadores un hecho en evidencia: los países de cultura sanitaria floreciente tienen una mortalidad infantil reducida; los pueblos con sanidad embrionaria tienen una mortalidad infantil aterradora. Y los hombres que sienten la preocupación de las vidas que se malogran, han profundizado en las causas de las siniestras cifras a que nos referimos, y han visto que las infecciones intestinales ocupan un lugar preeminente en este fúnebre honor. Y ya en camino de la verdad, se ha demostrado que la alimentación defecuosa a que se someten los niños en crianza artificial es el origen de la inmensa mayoría de infecciones intestinales seguidas de caquexia y de muerte.

Y en esta época de la vida ¿qué injiere el niño? No es difícil la respuesta, por cuanto la naturaleza proporciona el alimento que corresponde a nuestra primera edad. Pero la naturaleza fabrica la leche para ser consumida directamente de su órgano elaborador, o dicho de otra manera, sin ser alterada por agentes nocivos diversos.

La naturaleza nos da un líquido precioso que luego los microbios transforman en un veneno para el aparato digestivo de los niños. En vano los químicos han intentado con sus métodos establecer una policía de la leche. Sus técnicas, de una sensibilidad indiscutible, no han podido descubrir un tipo puramente biológico de alteración de la leche, que sólo descubre el organismo del niño en forma de alteraciones orgánicas y funcionales de diversos matices, pero siempre de consecuencias funestas para el reactivo humano que ilumina con su alegría la paz del hogar. No se puede negar que un fraude continuado en los componentes de la leche (aguado, desnatado), es motivo más que suficiente para hacer enfermar a un lactante. Pero no es éste el factor dominante en las alteraciones digestivas de la infancia; es la presencia en la leche de microbios diversos, con propiedades patógenas variables, por sí mismos o por los productos de su metabolismo, junto con las profundas alteraciones que ejercen sobre los componentes de la misma, donde hay que buscar las causas inmediatas de los trastornos digestivos por leches higiénicamente indeseables.

Al constatar el origen de tanto trastorno digestivo por leches alteradas, el sanitario lanzó a todos los vientos una consigna racional: "Hay que higienizar la leche". Por otra parte, los hechos le han dado sobradamente la razón. Ha visto que con sólo depurar la leche, la mortalidad, en los Institutos nipiológicos, descendía de una manera clara y definitiva, y los países con responsabilidad... y con medios, han establecido un control sanitario de este alimento, función que adquiere en algunos proporciones insospechadas de perfección y de eficacia.

Es, pues, una obra altamente social preocuparse de conseguir que la leche que se consume sea un líquido nutritivo absolutamente inocuo, y conservando todo lo posible las características de la leche fresca. He aquí la noble ambición del sanitario. Para él, lo único interesante es llegar un día en que los ciudadanos puedan consumir toda la leche que necesiten, sin peligro de enfermedades y de intoxicaciones, y que esta leche no haya sufrido modificaciones para garantizar su conservación.

Para ello establece una vigilancia rigurosa desde la cuadra hasta el detallista; imagina técnicas de control e introduce el frío como el factor más importante en la conservación de la leche. Su visión, amplia indiscutiblemente, se concreta en la valoración higiénica de nuestro producto. Con asegurarse de que la leche no tiene gérmenes patógenos y de que la cifra de los saprofitos, es discreta, ya se siente satisfecho y ha cumplido naturalmente una misión importantísima en favor de la infancia.

Pero, este magno problema tiene otro aspecto, menos sentimental ciertamente, pero no menos humano; el aspecto económico, que no puede separarse y mucho menos despreciarse, y que algunas veces será la clave del éxito en la cruzada pro leche higiénica.

Si al ganadero le decís que debe producir una leche más limpia, más higiénica, porque con ello salvará la vida de muchos niños, yo creo que de momento todos se sentirán un poco humanitarios y harán el propósito de convertirse en bienhechores de la humanidad. Pero cuando vean que esto les supone mayor trabajo, instalaciones costosas, una vigilancia escrupulosa y ciertas privaciones sin beneficio inmediato, el egoísmo acallará su bondad y el gesto romántico que esperábamos se convertirá en la continuación de una rutina de consecuencias fatales. Esta es la realidad por doloroso que sea reconocerlo así.

Pues bien: este problema de la leche higiénica podemos plantearlo desde el punto de vista de la economía ganadera, para concluir como consecuencia de una mejora sanitaria en una mejor valoración económica. La leche de reses enfermas, o recogida mal y conservada peor, es un producto de valor comercial pequeño, puesto que muchas veces el receptor urbano tiene que inutilizar o corregir con alcalinos para

poderlo aprovechar. Esta última solución, con riesgo de la acción fiscal de las autoridades sanitarias. Una leche buena es un producto que siempre tiene buen mercado, y será mejor todavía con el aumento de la cultura sanitaria del pueblo y de las posibilidades económicas del ciudadano en el camino firme de la justicia social. Pero, no termina aquí el beneficio que puede reportar al ganadero la adopción de los preceptos para obtener leche pura y limpia. No es solamente la cantidad de leche que se pierde por modificaciones microbianas que la hacen imposible para el consumo; es la mejora de su propia ganadería, en este caso la mejora de las fuentes de la leche. Una vaca tuberculosa es siempre un foco de contagio que no solamente se pierde a sí misma como capital que se malogra, sino que colabora con demasiada actividad en la contaminación de sus vecinas, en la destrucción de otros capitales idénticos. Hembra lechera tuberculosa es animal siempre depreciado, cuando no completamente destruido, y siempre una productora de leche mediocre o despreciable.

Una vaca con mamitis estreptocócicacontamina toda la leche a la cual se mezcla, merma su propia producción y amenaza reducir a límites inverosímiles la función mamaria de las reses de un estable. Mantener vacas que no dan leche no es, ciertamente, un gran negocio.

Y de las brucelosis ¿qué diremos? Si en realidad no se trata de una plaga de consecuencias económicas muy perceptibles, en cambio constituye actualmente el factor de una de las enfermedades humanas de más lamentable extensión. Un imperativo ciudadano y profesional de los técnicos sanitarios nos impone a todos no cejar en la lucha contra estos microbios, aun sabiendo las dificultades con que tropezamos en este arduo camino. Si no conseguimos un éxito rotundo, por lo menos habremos cumplido con nuestro deber. Y en la cruzada anónima de pelear por un mundo mejor con las armas de la paz, nadie debe regatear su esfuerzo.

En el transcurso de nuestras horas de trabajo en prosa, cabe siempre un espacio para tareas románticas, que sólo se cobran con la paz de nuestras conciencias; el refugio insobornable de todas las almas que saben dar un amplio y humano sentido al término que une todos los seres: Amor.

LA ASPIRACIÓN MÁXIMA

No prosigamos por este camino con pretensiones sentimentales y literarias. Todos estamos convencidos de la necesidad de conseguir una leche en mejores condiciones sanitarias. Tenemos una meta ideal: llegar a que toda la leche que se produzca pueda ser consumida cruda sin el menor riesgo. Pero esto es un sueño completamente irrealizable en este país... y en casi todos.

Todas las reses lecheras sanas debieran estar, por lo menos, exentas de tuberculosis, de mamitis y de brucelosis. Las personas que in-

tervienen en todas las manipulaciones, correctamente vigiladas en cuanto a su posibilidad de portadores de gérmenes peligrosos. Todas las operaciones realizadas con esmero, utilizando utensilios estériles y prodigando el frío con la máxima generosidad.

No hace falta mucha sagacidad para darse cuenta de que esta utopía encantadora es casi una locura en nuestro país, donde el problema del abasto de leches es una vergüenza o una comedia sarcástica. Tenemos leche más bien escasa que abundante, pero lo más divertido es que parece que las vacas elaboran diversas categorías de leche, a juzgar por los precios distintos que tiene este producto en un mismo establecimiento.

Seguramente, por razones que escapan a nuestra imaginación simplista, las autoridades toleran estos abusos, que a la larga sólo sirven para fomentar el egoísmo de los codiciosos, creando una casi impunidad en el engaño de los ciudadanos, que van acostumbrándose a pagar el agua al precio de la leche.

Todo esto, muy poco optimista por cierto, unido a la ingente labor educativa que sería preciso desarrollar para obtener la leche ideal, hace que de momento reduzcamos el horizonte de nuestras ambiciones a conseguir una discreta y racional leche depurada, que ha de constituir nuestra

ASPIRACIÓN MÍNIMA

Pero, si de momento, sin abandonar en absoluto la posibilidad de obtener leche cruda y certificada, nos concretamos a depurar conscientemente la leche del mercado público, es preciso que nos pongamos de acuerdo en lo que entendemos por depuración de la leche.

¿Vamos a admitir como leches aceptables sanitariamente, lo mismo, las pasteurizadas a 65°, que las a 75°, que las esterilizadas a 110°? De ninguna manera.

Intentemos precisar cómo queremos que sea una leche depurada.

1.º No debe contener en forma activa germen alguno de tuberculosis, brucelosis y estreptococos, como específicos de enfermedades del ganado, ni otros con características de patogenidad para el hombre.

2.º De la flora más o menos trivial que pulula por la leche, habrá desaparecido como ser viviente, la inmensa mayoría. Título colibacilar negativo y total de gérmenes vivos no superior a 100.000 por c. c.

3.º El procedimiento empleado para la depuración habrá respetado al máximo las características biológicas fundamentales de la leche: enzimas, vitaminas, estabilidad proteínas, dispersión grasas, etcétera.

Creemos que no es pedir mucho que se defina claramente, cuáles deben ser las características de la leche que se presume pasteurizada o depurada. Porque, higiénicamente, no es lo mismo una leche este-

rilizada a 110° o bien otra sometida durante segundos a 75°. La primera ha perdido sus enzimas, apenas le quedan vitaminas, una buena parte de las albúminas se han coagulado, sus posibilidades de coagulación por el lab, apenas existen, etc. Y esto realmente no puede llamarse leche higiénica, so pena de que nos haga ilusión el placer de engañarnos tranquilamente.

En cambio, una depuración racional, bien llevada técnicamente, permite obtener una leche con características muy poco dispares de las que presenta la leche cruda y conservada en buenas condiciones.

¿Se preocupa el sanitario de este aspecto importantísimo del abasto de leches? ¿Y si no contestáramos a esta pregunta?

Resumiendo nuestro pensamiento, compatible con nuestra actual organización técnica y sanitaria, diremos que la primera etapa hacia una higienización modelo de la leche debemos cifrarla en obtener un producto depurado con suficientes garantías.

UN PARÉNTESIS INDISPENSABLE

En el transcurso de estas notas usamos indistintamente las palabras depuración y pasteurización, y conviene que nos entendamos perfectamente. En ambos casos queremos decir leche higienizada, o lo que es lo mismo, leche que ha sido sometida a un procedimiento físico tendente a esterilizarla en las mejores condiciones posibles.

No se olvide que por la literatura internacional de cuestiones lecheras, se admiten generalmente los siguientes tipos de depuración:

- a) Leche pasteurizada a baja temperatura: 63° — 65° durante 30 minutos.
- b) Leche a pasteurización alta: 80° y tiempo variable.
- c) Leche esterilizada: 110° de 15 a 25 minutos.
- d) Leche stassanizada a 75° durante segundos.

La última clasificación hoy debe desaparecer con este nombre, puesto que el método de capa delgada ha sido industrializado por diversos constructores, y por tanto, es más exacto decir método de la capa fina.

Todos estos procedimientos tienen sus partidarios y sus detractores. Con un poco de buena voluntad y mirando únicamente los intereses sanitarios, los más en boga que recogen la mayoría de sufragios, son los de pasteurización baja y los de capa delgada.

La pasteurización alta y la esterilización tienen el grave inconveniente de dar a la leche el sabor a cocido y desnaturalizarla de una manera lamentable. De los dos preferidos, el de pasteurización baja requiere una instalación voluminosa cuando hay que higienizar una gran cantidad de leche. Pensemos que hace falta un dispositivo para llevarla a los 65° y una serie de tanques isotermos para conservarla a esta temperatura durante el tiempo necesario.

Y nos queda la de la capa delgada, que no requiere gran volumen y que, además, presenta la enorme ventaja de un costo de calefacción sensiblemente inferior.

Aclarados estos puntos, el lector deberá entender que cuando escribimos depurar o pasteurizar nos referimos siempre al sistema que quiera adoptarse de higienización, y que para nuestro subconsciente no involucre para nada los procedimientos mediocres de esterilización al autoclave y los de pasteurización a temperatura alta.

EL PRIMER PASO

Si nos decidimos a establecer un tipo de leche depurada correcta, es indispensable fijar sus características. En algunos países este producto tiene una definición precisa en las leyes que rigen la higiene de la leche.

En este particular no somos partidarios de una copia literal de las exigencias alemanas, inglesas o norteamericanas. Cada país tiene su estructura de producción, dispone de sus medios y cuenta con organizaciones específicas que no siempre son fáciles de imitar.

Mejor resultado podríamos sacar de nuestro atraso en esta cuestión, aprovechando la experiencia de los que nos preceden, con ahorro de tanteos, ensayos y modificaciones. ¿Por qué no comenzamos por establecer un tipo de leche pasteurizada con un mínimo de garantías de desnaturalización?

Sin que esto signifique nada definitivo, podríamos exigir que este tipo de leche pasteurizada fuera sometida a una temperatura que respetara la mayoría de las características biológicas, que destruyera los gérmenes patógenos, que hiciera prácticamente nulo el título colibacilar y que conservara la facultad de ser coagulada por el fermento lab. Esta leche, rigurosamente vigilada, podría llevar la garantía de los servicios sanitarios.

¿CÓMO ESTABLECER ESTE CONTROL?

En primer término, sería preciso la comprobación de las instalaciones. Bien es verdad que no poseemos estaciones lecheras de investigación, pero tenemos servicios técnicos industriales y laboratorios sobradamente capacitados para certificar que una instalación determinada posee un dispositivo adecuado y que de su funcionamiento resulta un producto con las condiciones exigidas.

Esto para empezar. Luego, un servicio de vigilancia sanitaria permanente continuaría la labor.

No todas las plantas de higienización de leche que tenemos en marcha reúnen las condiciones apetecidas. La mayor parte son anticuadas y los principios técnicos de su construcción no responden a las posibilidades que ofrecen los métodos modernos. Otras, poseyendo buen material, no funcionan con la debida escrupulosidad y precisión, dando

un rendimiento higiénico muy alejado de aquel teóricamente previsto.

En la actualidad, la experiencia ha demostrado que los métodos de alta temperatura (75°) y tiempo corto (30 segundos) satisfacen todas las exigencias. Al primitivo modelo de Stassano, fabricado por la casa Silkeborg, a base de tubos, ha seguido el sistema de placas, que por su fácil manejo y limpieza se ha impuesto definitivamente. Existen diversas casas que construyen aparatos de estas características.

Pero, no sólo radica en ésto la garantía de una buena higienización. Es indispensable un enfriamiento rápido para que los pocos gérmenes que pudieron escapar a la acción destructora del calor no pululen ampliamente en la leche, libres de concurrencias más o menos antagónicas.

Es preciso también que todos los aparatos posean registradores de temperatura, perfectamente precintados, para que el inspector pueda comprobar el correcto funcionamiento del dispositivo de depuración. Y por último, el laboratorio deberá comprobar el resultado final, a partir de muestras tomadas del mercado, para cerciorarse de que la leche, después de depurada, ha sido conservada en las condiciones apropiadas para su mantenimiento higiénico.

Además, por los métodos analíticos que hoy poseemos se podría descubrir el posible fraude de añadir leche fresca a la leche pasteurizada. Todo ello, naturalmente, no olvidando que una leche de esta categoría deberá ser entera, sin el aguado profuso y el desnatado frecuente de nuestras leches actuales.

Casi parece una impertinencia insistir en otros detalles en este esquema, pero no quisiéramos se sospechara de olvido. Así pues, importa un control sanitario del agua que se vaya a utilizar en la instalación. La existencia de buenos dispositivos para la perfecta esterilización de toda clase de utensilios y material, que asimismo será objeto de comprobación. La vigilancia sanitaria de todas las personas encargadas de las diversas manipulaciones. La limpieza de los locales. El establecimiento de una lucha eficaz contra las moscas. La filtración previa por dispositivo estático o por centrífuga...

Y AHORA HABLA EL LABORATORIO

La higiene, en su demanda de una leche sana, precisa de instrumentos que garanticen las cualidades que exige. Y pide a los técnicos que le aseguren que un producto que va a garantizar reúne las condiciones de las cuales responde.

En primer término conviene disponer de un método que permita comprobar que la leche ha sido eficazmente calentada en vistas a la destrucción de los gérmenes patógenos. Para ello poseemos diversos procedimientos, que transcribimos al final de este trabajo, y que en la presente relación solamente nombraremos con ligeros comentarios.

Existen muchos métodos para comprobar que la leche es efectivamente depurada. No obstante, no todos tienen la misma precisión y la constancia de resultados que deseamos de ellos. Probablemente la determinación de las fosfatases y el método de Schern-Gorli son los mejores. Por lo menos esta es nuestra impresión por los ensayos que hemos realizado. Desde luego, no son demasiado fáciles, y acaso en este punto, como en otros relacionados con este problema, no sería superfluo que una comisión de técnicos especializados en estas cuestiones dictaminara acerca de los métodos más convenientes a poner en práctica en nuestro país, teniendo en cuenta las características de nuestra producción y los medios de laboratorio de que disponemos con cierta constancia. Bien entendido que este dictamen debería ser provisional y modificable, como resultado de la experiencia y de las posibles facilidades en la adquisición de material y dispositivos. Disponemos también de la reacción de Bengen y de las catalasas.

Luego, como índice de la eficacia de la depuración, se recomienda la determinación del título colibacilar. Para ello se conocen también muchas técnicas, algunas de ellas de gran finura. En esta cuestión estamos de acuerdo con Rochaix y Tapernaux al afirmar que no es preciso utilizar métodos complicados con fines de clasificación microbiana. Lo que importa es determinar la existencia de este germen multiforme, como indicador de contaminación, por el hecho importantísimo de tener una temperatura letal que coincide con la de la inmensa mayoría de los gérmenes patógenos que nos interesa destruir. Además, es muy interesante vigilar la correcta conservación de la leche ya depurada, pues si no ha sido rápidamente enfriada y colocada en recipientes rigurosamente estériles, cuando llegará al consumidor habrá perdido todas las virtudes que pretendíamos conseguir.

Para ello podemos valernos del clásico método de Orla-Jensen al azul de metileno, que en la actualidad han mejorado los americanos, estableciendo una constante de composición en el reactivo que se emplea. Modernamente, los alemanes han preconizado la técnica de la resazurina, que parece tiene indiscutibles ventajas sobre el azul de metileno.

Con tres o cuatro técnicas bien resueltas, no es difícil establecer una vigilancia rigurosa sobre la calidad de la leche depurada. Naturalmente que no todo debe dejarse al laboratorio. Las instalaciones deben ser objeto de periódica inspección, con el fin de comprobar la eficiente marcha de los diversos dispositivos.

Existe un aspecto de la leche depurada, de indiscutible importancia dietética, y que sería interesante precisar en nuestro país. Queremos referirnos a la valoración del ácido ascórbico en la leche, puesto que es la única vitamina que se puede determinar con relativa facilidad en el laboratorio, sin necesidad de ensayos en animales. Es un punto que no está claro, a juzgar por la bibliografía que conocemos,

y es posible que por encima de los métodos de análisis, los resultados dispares tengamos que achacarlos a la alimentación y al clima donde residen las hembras lecheras. Es una sugerión no desprovista de interés para los hombres con inquietudes de mística sanitaria.

PARA OBTENER EL CERTIFICADO DE GARANTÍA

Confesamos que, en principio, nos repugnan las excesivas intervenciones, pero en este caso creemos que no existe otro camino para poder asegurar una prudente garantía para el consumidor. El industrial que no pretende que su leche circule con el marchamo de garantizada, puede instalar su dispositivo como guste, puesto que su responsabilidad no queda avalada por los organismos sanitarios. Pero aquel que quiera valorar su mercancía con la etiqueta de comprobación oficial, es preciso que se sujeté a un formalismo de suficiente rigidez para que el público pueda confiar tranquilamente en las condiciones de la leche que se le prometen.

Una instalación higienizadora de leche debe ser estudiada previamente por técnicos industriales y sanitarios. Una vez montada, será objeto de minuciosa comprobación en su aspecto mecánico, para asegurarse de su perfecto funcionamiento.

Inmediatamente se procederá a la comprobación de la eficacia depuradora. Se inocularán varios cobayos con sedimento de leche centrifugada, con el propósito de averiguar si quedó vivo algún bacilo de Koch. A las tres o cuatro semanas se puede ya intentar una prueba de tuberculina y más tarde se sacrifican los animales para hacer una necropsia minuciosa. Estos mismos cobayos pueden servir para determinar la presencia de aglutininas anti-brucela, como asimismo se utilizará el hígado recogido asepticamente para hacer siembras en medios y ambientes apropiados que permitan el posible cultivo de las brucelas.

Deben hacerse siembras en medios especiales, el de Kimmer por ejemplo, para buscar los estreptos de la mamitis, caso de quedar vivos. Se determinará el título colibacilar, por uno cualquiera de los múltiples métodos preconizados en la abundante literatura sobre esta cuestión. Se verificará el número total de gérmenes que permanecen con capacidad colonizadora después de la depuración, por medio de las siembras en placas. Se debe estudiar también la facultad de ser coagulada por el lab. fermento y la rapidez de separación de grasa. Y si se llegara a conclusiones firmes en el estudio de la vitamina C su determinación no sería de escaso valor.

A la vista de todos estos antecedentes se dictaminaría la procedencia de su funcionamiento definitivo. En caso contrario se deberían estudiar los factores que pueden tener influencia en los resultados poco satisfactorios para resolverlos con miras a las garantías exigidas.

RESUMEN CRÍTICO

Pocos aspectos de las funciones sanitarias han sido discutidos con tanta prodigalidad y apasionamiento como el problema de la pasteurización de la leche. Bien es verdad que la gran mayoría de sus detractores se agrupan en torno de los sanitarios intransigentes, que fundamentan sus censuras en el hecho de creer que prodigando la pasteurización se apagarían los estímulos y los esfuerzos hacia la solución ideal de conseguir leche natural exenta de todo peligro al ser consumida cruda.

Una comisión de la S. D. N. en su organismo de Higiene, recogió y comentó todas las objeciones que se presentaron. De todas ellas, la más curiosa, la que constituye una verdadera filigrana de profilaxis, es la que cree que la obligatoriedad de la pasteurización aumentaría el número de tuberculosis pulmonares en los adultos, por no haberse creado en la primera infancia el complejo primario formado con bacilos de Koch de tipo bovino procedentes de la leche. Creemos que no vale la pena de discutir este aspecto, que entre otras soluciones tiene en la actualidad al B. C. G., que después de unos años de silencio parece surgir con nuevos entusiasmos.

Este puritanismo sanitario se encuentra quintaesenciado en un folleto recientemente publicado por John P. Bibby cuyo subtítulo no tiene desperdicio: "A Statistical examination of the claim that Pasteurisation of Milk saves lives".

Nosotros respetamos todos los criterios sostenidos con sinceridad, pero entendemos que renunciar a una solución provisional y claramente satisfactoria en la lucha contra la mortalidad infantil, por el prurito de una solución ideal y hoy por hoy inasequible, es casi suicida y totalmente desprovisto de sentido práctico.

Estamos convencidos de que la depuración física con los elementos de que disponemos modifica sensiblemente las cualidades nutritivas de la leche, pero entendemos que es preferible esto a ver cómo las estadísticas de mortalidad infantil, por causas atribuidas a la leche, presentan cifras alarmantes. Por otra parte, los progresos de la técnica continúan ofreciendo iniciativas que tienden a mejorar los rendimientos obtenidos con los métodos que podríamos considerar clásicos. Así, vemos que se ha ensayado la pasteurización eléctrica a base de electrodos alimentados por corriente de 220 voltios y 60 períodos. La aplicación de radiaciones ultra-violeta por medio de la lámpara de cuarzo y actuando en capa fina. La utilización de ondas cortas de una longitud de 3 metros aproximadamente...

Pero todas estas novedades no han salido todavía de los laboratorios de investigación, y no cuentan con el referéndum de una discreta experiencia industrial. Esto no obstante no es razón para perder la fe en el hallazgo de una técnica que satisfaga a los más exigentes.

RECOPILACIÓN DE TÉCNICAS

Con un pequeño esfuerzo bibliográfico, hemos colecionado un respetable número de métodos aplicables al objeto de este trabajo, orientados preferentemente al control de la leche depurada y a su conservación racional. Creemos que puede servir como fuente informativa para un estudio práctico de esta tarea sanitaria que apenas está esbozada en nuestro ambiente. El lector avisado verá que no hemos transcritos los métodos de siembra en placa, de contejo microbiano y de valoración del título colibacilar. Los hemos omitido adrede, porque pueden encontrarse con facilidad en múltiples publicaciones aparecidas en nuestro país. Por otra parte, no son esenciales al motivo fundamental de estas sugerencias, que deseáramos fueran el origen de soluciones prácticas y eficientes en pro de una leche decorosamente higiénica.

DETERMINACIÓN DE LA FOSFATASA. — 1. — **Reactivos:** Amortiguador. Disolver 1,09 gr. de fenil fosfato disódico y 11,54 gr. de dietil barbiturato sódico, en agua saturada de cloroformo y completar hasta 1 litro. Agregar unas gotas de cloroformo para evitar posibles contaminaciones y guardar en la cámara fría.

2. — **Reactivivo de Folin y Ciocalteu.** Disolver 100 gr. de tungstato sódico y 25 gr. de molibdato sódico en 700 c. c. de agua en un frasco con condensador de reflujo. Añadir 50 c. c. de ácido fosfórico siruposo y 100 c. c. de ácido clorhídrico concentrado. Calentar durante 10 horas con el dispositivo de reflujo. Enfriar y añadir 150 gr. de sulfato de litio puro, 50 c. c. de agua y 4-6 gotas de bromo líquido. Hervir la mezcla dentro de la vitrina, sin condensador, durante 15 minutos para reducir el exceso de bromo. Enfriar, llevarlo a $\frac{1}{4}$ litro y filtrar. El reactivo terminado deberá tener un color amarillo dorado sin el menor tono verdoso. Protegerlo del polvo. Para el uso diario diluir 1 volumen de esta solución madre con 2 volúmenes de H_2O .

3. — Una solución de carbonato de sosa anhidro al 14 por 100. De calidad analítica. (En nuestros ensayos con esta técnica, hemos utilizado estos reactivos, preparados por la casa British Drug Houses, Ltd.).

Técnica del ensayo rápido. Prueba A. — Colocar 10 c. c. de solución amortiguadora en tubos de 25 c. c. y añadir 0,5 c. c. de leche bien mezclada. Utilizar pipetas bien calibradas y diferentes para cada muestra. Mezclar fuertemente y al baño maría a 47° durante 10 minutos. El nivel del agua no será inferior al nivel del líquido de los tubos. Agitar los tubos durante el baño y enfriar luego hasta 20° sumergiéndoles en agua fría. Añadir 4,5 c. c. del reactivo de Folin-Ciocalteu y dejar a temperatura ambiente por tres minutos. Filtrar por papel resistente a los ácidos y recoger 10 c. c. de filtrado, preferentemente en tubos aforados, y añadir 2 c. c. de la solución de carbonato

sódico. Poner al baño maría hirviendo, durante dos minutos y enfriar.

Hasta poseer un completo dominio de la técnica es conveniente trabajar con dos tubos de prueba, y para cada sesión deben hacerse también dos tubos testigos, operando así: Colocar a dos tubos de 10 c. c. de reactivo amortiguador y 4,5 c. c. del reactivo Folin-Ciocalteu. Mezclar y añadir 0,5 c. c. de leche. Guardar en la temperatura ambiente durante tres minutos y filtrar sin previo calentamiento. A 10 c. c. del filtrado añadir 2 c. c. de la solución de carbonato sódico. Poner al baño maría hirviendo y enfriar después de dos minutos de incubación.

La leche correctamente pasteurizada debe dar una coloración azul inferior a 2,3 unidades según el tintómetro de Loviboud. A falta de este aparato puede utilizarse una célula construida por la misma casa y que tiene un disco correspondiente a 2,3 unidades azul, y que sirve perfectamente como comparador de tonos superiores e inferiores a esta cifra. Los tubos testigos sirven para indicarnos, en caso de tomar coloración vecina a 2,3 azul, que los reactivos no funcionan normalmente.

Técnica del ensayo lento. Prueba B. — Sirve para determinar pequeños errores en las operaciones de depuración. Colocar 10 c. c. de reactivo amortiguador en tubos de 25 c. c. y 0,5 c. c. de leche cuidadosamente mezclada, con las mismas precauciones indicadas en la prueba anterior. Añadir 3 gotas de cloroformo y tapar los tubos con tapones de goma. Mezclar el contenido invirtiendo varias veces los tubos. Incubar durante 24 horas aproximadamente a 37°. Enfriar hasta 20° y añadir 4,5 c. c. del reactivo de Folin-Ciocalteu. Mezclar perfectamente y guardar a la temperatura ambiente durante tres minutos. Filtrar, y a 10 c. c. del filtrado tirar 2 c. c. de la solución de carbonato de sosa. Colocar al baño maría hirviendo durante 2 minutos exactamente, y comprobar la intensidad del color azul con el tintómetro o la célula descrita.

Deben también hacerse tubos testigos, omitiendo la incubación de 24 horas.

Este procedimiento es extraordinariamente sensible, pues descubre pasteurizaciones incorrectas por defecto de tiempo o de temperatura, como asimismo pone de manifiesto la presencia de pequeñas cantidades de leche fresca que pudieron ser añadidas (el 2 por 100).

Puede dar motivo a resultados falsos la actividad de ciertos microbios termófilos que elaboran pequeñas cantidades de fenol. La leche calostral tampoco tiene gran cantidad de fosfatas, pero este inconveniente es mínimo, ya que por lo común se investiga sobre leches mezcladas.

Referencias: Key y Graham, *The Jour. of Dairy Research*, 1936, vol. VI, núm. 2, mayo. — Buck, *Am. Jour. Pub. Health*, 1942, 32, págs. 1224. — Key, *Imp. Bur. Dairy Scien*, Ingl., 1939, 4, I. — Key y Heave, *The Lancet*, 1935, junio, 29, página 1516. — Van Bever y J. Straub, *Le Lait*, abril-junio, 1943, págs. 97.

VALORACIÓN DE LA VITAMINA C (ÁCIDO ASCÓRBICO). — *Método de Martini y Bonsignore*: Tomar 10 c. c. de leche y defecarla con un volumen igual de una solución de ácido tricloracético al 20 por 100. Filtrar por papel seco y colocar 10 c. c. del filtrado en un Erlenmeyer o en una cápsula de porcelana, de una capacidad de 100 c. c. Añadir 5 c. c. de una solución tampón de citrato, (37,5 gr. de citrato sódico y 10 gr. de bicarbonato sódico en 250 c. c. de agua) y 2,5 c. c. de una solución reciente de hiposulfito sódico al 5 por 100.

Se expone a la luz intensa (luz solar o una lámpara de 500 W.) y se titula con bureta, hasta aparición de una leve coloración azul, con una solución de azul de metileno al 0,1 gr. por 1.000. Para determinar el punto final se utiliza como testigo una solución preparada con 10 c. c. de solución de tricloracético al 10 por 100 y 1-2 gotas de la misma solución de azul de metileno. La valoración del azul de metileno se realiza en las mismas condiciones con una solución *estándard* de ácido ascórbico al 0,05 por 100 por pesada (ácido ascórbico levógiro Kahlbaum) y cuya riqueza se verificó con una solución 0,005 N de yodo, sabiendo que por una molécula de ácido ascórbico se necesitan 2 átomos de yodo. Se puede sustituir con ventaja el ácido tricloracético por el ácido sulfosalicílico al 20 por 100.

Cálculo del ácido ascórbico: Si de la mezcla de 10 c. c. de leche 10 c. c. de tricloracético resultan 18,5 c. c. de filtrado, tendremos que 10 c. c. de filtrado corresponden a 5,4 de leche. Por tanto tendremos:

$$\text{Mgr. 0/00} = \frac{n \times 0,945 \times 100}{5,4}$$

n = al número de c. c. de azul de metileno; 0,945 = factor.

Método de Lojauder: En 5 matraces de Erlenmeyer se colocan 20 c. c. de leche a examinar, y luego se añade al matraz 1. 1 c. c. y al 2. 2 c. c. y así sucesivamente, de la solución al 1/1000 de 2-6 diclorofenolindofenol. La leche se puede acidificar ligeramente con ácido

$$\text{sulfúrico} \frac{10}{N}$$

Se colocan los matraces en un armario durante 10 minutos y se sacan luego de la oscuridad para ver los resultados. El contenido en ácido ascórbico corresponde al número del matraz correspondiente entre aquel que todavía tiene color y aquel incoloro. Es preciso, naturalmente, saber el valor correspondiente a la solución de reactivo en relación a la vitamina C.

Este método no es aplicable a las leches profusamente contaminadas, ya que contienen probablemente substancias reductoras.

Referencias: Lojauder, *Le Lait*, febrero, 1938, pág. 166. — L. Burujana, *Le Lait*, mayo 1939, pág. 449. — F. Gstirner, "Métodos físicoquímicos para la determinación de vitaminas", Barcelona, 1944. — Harris y Thimann, "Vitamines and

Hormones", Nueva York, 1943. — José Ruiz Gijón, "Métodos biológicos de valoración de hormonas, vitaminas y drogas", Madrid, 1943.

LAS REDUCTASAS MICROBIANAS. — Es conveniente establecer una clara separación entre las reductasas propias de la leche y demostrables por sus técnicas especiales y aquellas otras elaboradas por la actividad microbiana y que se valoran por el método universalmente conocido de Orla-Jensen. Esta valoración ofrece resultados no siempre concordantes con el conteo microbiano. La aparente paradoja puede explicarse por la diversa capacidad que tienen los microbios de reducir el oxígeno que encuentran en el medio de cultivo. Por esta razón, los datos que proporciona no son de un rigorismo matemático. Imaginamos que no sería inoportuno realizar un extenso estudio de comprobación, ya que siendo el tipo de microbios los que imprimen la actividad óxido-reductora, acaso en nuestro país las cifras que se obtengan difieran de las publicadas por investigadores extranjeros, por no darse el caso de que sea exactamente la misma la flora dominante.

Por otra parte, parece que la disparidad de resultados puede achacarse, en parte, a las diferencias de técnica y de reactivos empleados. Por esta razón es indispensable atenerse a un protocolo uniforme. En la actualidad los americanos han propuesto una técnica *estándar*, que siguen ya la mayoría de investigadores. Es la siguiente:

A 10 c. c. de leche se añade 1 c. c. de solución de azul de metileno. El material a emplear será estéril. Los tubos, sin agitar para que no formen espuma, se tapan con capuchón de goma y se colocan a la estufa a 37°. La solución se prepara disolviendo una tableta Orla-Jensen en 800 c. c. de agua. El azul de metileno tiene una concentración de 0,005 por 100.

Recientemente, Thornton y Sandin, para aumentar la precisión del método han propuesto la adopción del sulfocianuro de azul de metileno que consideran de más fácil obtención y de pureza más constante que el cloruro de azul de metileno usado corrientemente. Preconizan como constante de reactivo, que el azul entre, en su mezcla con la leche, en la proporción de uno de colorante por 300.000 de leche. De esta manera las soluciones podrían adaptarse fácilmente a la dilución *estandard*.

Otro aspecto en litigio es el tiempo de decoloración, que es preciso fijarlo después de larga experiencia. Con todos estos elementos, no creemos sea un problema complicado establecer un *modus operandi* oficial para que todos los resultados se puedan superponer.

Referencias: A. Eyrard y S. Rey, *Le Lait*, octubre-diciembre, 1943, pág. 295. — Thornton y Sandin, *Am. Jour. of Pub. Health*, vol. XXV, pág. 1114. — Guittonneau, *Le Lait*, enero 1941, pág. 1.

ENSAYO DE LA RESAZURINA. — Esta prueba, que tiene el mismo fundamento que la del azul de metileno según Orla-Jensen, se introdujo

en la práctica lechera en Alemania por Peach y Simmert en 1928. Desde entonces ha sido objeto de diversas modificaciones, y se conocen varios trabajos de crítica de sus resultados y método operatorio. En Inglaterra es donde el procedimiento ha tenido mayor difusión, hasta el extremo de ser adoptado como *test* oficial, y por esta razón suponemos que lo más práctico es traducir de la última edición de C. H. Chalmers los detalles pertinentes, para que el lector tenga una idea exacta del método.

Fundamento de la prueba. — Cuando una pequeña cantidad de una solución diluida de *Resazurina* se añade a la leche, y la mezcla se mantiene a 37,5° el color experimenta una reducción grande, a causa de la actividad metabólica de los organismos presentes. La reducción se verifica en dos tiempos: durante la primera fase el color se cambia en resorufin, y el proceso pasa a través de una serie de claros y bien definidos cambios de color, como azul, lila, malva, rosa malva, malva rosa y rosa. Aunque esta fase reductora es fuertemente catalizada por la luz, no es reversible, y por esto no es influenciada por la exposición al aire libre. La segunda fase, llamada el cambio del color resorufin por la coloración del dihidro-resorufin, es reversible, y por lo tanto el contacto con el oxígeno atmosférico puede ocasionar la modificación del tono resorufin.

Estos cambios de color pueden ser valorados en el comparador de Levibond, y para su precisión cada tono es dado en números. Así, la primera serie de cambios se mide de 6 a 1 y la segunda de 0 a 1. La actividad de las bacterias de la leche puede ser medida por esta prueba por el tiempo empleado en cada reducción completa de color o bien por el color producido en un período de tiempo fijo.

Edad de las muestras cuando son investigadas. — Como la resazurina es extremadamente sensible a todo mecanismo de reducción, aparte el ocasionado por el metabolismo microbiano, es aconsejable, en el caso de leches discretamente limpias, guardar las muestras durante 24 horas en una cámara de temperatura constante. Durante este tiempo la actividad microbiana se completa, y por lo tanto el poder reductor de los mecanismos normales no enmascara la reacción. No obstante, cuando se trata de leches muy sucias o de vacas con mamitis, se puede prescindir de esta incubación.

Técnica de la prueba. — Los tubos de ensayo que se utilicen serán los recomendados por el British Standards. El baño maría estará provisto de tapadera y la temperatura se mantendrá escrupulosamente a 37,5° con oscilaciones máximas de 0,5°, a base de un buen termostato.

Agitar la muestra de leche unas 25 veces, flamear el cuello del frasco, y tomar 10 c. c. que se verterán en tubos de 152/16, con aforo en los 10 c. c., y, con las precauciones de asepsia corrientes, añadir 1 c. c. de la solución *estandard* de resazurina. Se procurará que la pipeta no contacte con la leche.

Con fórceps o pinzas estériles colocar un tapón de goma esterilizado. Estos tapones se esterilizarán por ebullición. Se invierten los tubos un par de veces para realizar una mezcla completa y se colocan al baño mantenido a 37,5°. Se tapa y se anota el tiempo. Es importante que el nivel del agua exceda un poco el nivel de la leche en los tubos. En el proceso de reducción, el color del tinte varía del azul al rosa fuerte con tonos intermedios y finalmente del rosa a la decoloración. Para facilitar la observación se recomienda no trabajar al mismo tiempo con un número de muestras superior a 10.

Habida cuenta de que la luz solar cataliza el color del reactivo, los frascos de solución y los tubos de trabajo deben guardarse al abrigo de la luz. La solución de Resazurina se guardará en la nevera y sólo se tomará en frascos aparte la cantidad suficiente para el ensayo del día. El color amarillento de algunas leches puede modificar sensiblemente el tono final de la reacción y hacerle de difícil interpretación. En estos casos un tubo de leche sin reactivo puede servir de comparación.

Los tubos son examinados de tiempo en tiempo anotando los colores observados, o bien determinar el tiempo que tarda en obtenerse un color fijo. Las primeras fases de la decoloración pueden ser ocasionadas por factores independientes de la actividad microbiana.

El primer método de observación sólo tiene valor para clasificar leches francamente anormales, mientras que el segundo, es decir, el que va desde el rosa al decolorado es el que sirve para catalogar precisamente la actividad microbiana. En ambos métodos es necesario, para interpretar los resultados, la anotación correcta del tiempo invertido desde la producción de la leche hasta su ensayo.

Al examinar los tubos en el aparato de Leyibond tégase presente que hay que colocar un tubo con leche sin reactivo en la célula reacción que sale del baño maría. El comparador debe colocarse ante una buena luz, preferible solar. Si ésta no es practicable se utilizará una lámpara de "luz de día" o mejor aún un tubular fluorescente. El operador, mirando directamente en el comparador girará el disco hasta coincidencia de color. Si el tono del tubo de reacción no coincide exactamente con un color de la escala se tomá como número el intermedio correspondiente. Si coincide con el blanco será 0.

Escala para juzgar la calidad de una leche.

Color después de una hora de incubación	Disco número	Calidad de la leche
Azul	6	Satisfactoria
Lila	5	
Malva	4	
Rosa malva	3	Discreta
Malva rosa	2	
Rosa	1	
Decolorado	0	Mala

Solución de Resazurina: Polvo de resazurina 0,1 gr.; H_2O 200 c. c. Calentar durante 30-60 minutos y guardar en la nevera. Para su uso diluir esta solución madre al 1/10.

Referencia: C. H. Chalmers, "Bacteria in relation to the milk supply", Londres, Edward, Arnold y C. 1945.

EL PROCEDIMIENTO DE BENGEN. — He aquí otro método para averiguar si la leche ha sido calentada y sus probables mezclas. Se funda en el hecho de que determinadas proporciones de albúminas son coaguladas a temperaturas que oscilan entre 68° y 65° , temperatura que corresponde exactamente a varios procedimientos de pasteurización. Por lo tanto, los sueros de leche calentados a 71° darán enturbiamiento cuando proceden de leche pasteurizada hasta 65° , y si el enturbiamiento aparece antes de los 70° indica que no ha sido correctamente pasteurizada.

El *modus operandi* consiste en tomar dos muestras de la misma leche. Una se calienta a 63° - 65° durante 20 minutos y la otra se conserva sin calentar. Ambas se tratan por sulfato amónico finamente pulverizado, en la proporción de 4 gramos por 20 c. c. de leche. Se agita fuertemente para facilitar la disolución y se filtra por papel hasta obtener un suero límpido. Una vez esto conseguido, se colocan las dos muestras al baño maría regulado a 65° . La muestra testigo calentada por nosotros debe permanecer transparente, como asimismo la otra si procede de leche pasteurizada. Elevando la temperatura a 71° aparecerá también un ligero enturbiamiento. Si la muestra calentada por nosotros permanece transparente y la otra se enturbia, seguramente la leche no ha sido suficientemente pasteurizada o bien contiene leche cruda en proporción diversa.

Mietche y Haden, que han dedicado gran atención a este método, le consideran de fácil manejo y de gran sensibilidad. Han precisado, además, las condiciones de interpretación y han establecido estos índices:

A	{	Diferencia de turbidez	0
		Grado de turbidez	0

Leche calentada por lo menos a 63° - 65° durante 5 minutos, o menos tiempo a mayor temperatura.

B	{	Diferencia de turbidez	1 a 3
		Intensidad de turbidez	1 a 8

La leche no ha sido sometida 5 minutos a 63° - 65° , o bien contiene parte de leche cruda. Cuanto más alejadas son estas cifras de la unidad, mayor será la cantidad de leche cruda mezclada o menor la temperatura y el tiempo de pasteurización.

C	{	Diferencia de turbidez	más de 4
		Intensidad de turbidez	8 a 30

La leche se puede considerar cruda.

Como es obvio observar, para trabajar con estos índices, es indispensable poseer tubos patrón, y tener un hábito experimental bien probado.

Referencias: M. F. Bengen, *Zeits. Vutersuchung. Lebem.*, vol. LXVI, 1933, página 1057. — M. F. Bengen, *Molkerei Zeitg.*, vol. XLVII, 1933, pág. 1973.

LA REACCIÓN ANULAR DE SCHERN-GORLI. — Esta prueba, descrita primeramente por Schern y Gorli en 1930, ha sido estudiada y mejorada por diversos investigadores, entre ellos Kohn y Klemm, Tapernoux y Pien y S. Baise. Permite distinguir las leches crudas de las leches pasteurizadas a partir de 66-67° y tiempos máximos de un minuto, como acontece en las técnicas de capa delgada, sea en tubo, sea en placas. Por el método original de Schern-Gorli, se utilizaban suspensiones de glóbulos rojos de cobayo lavados. Las dificultades de obtener este reactivo hemático y su escasa conservación han movido a buscar sustitutivos más estables y fáciles de proporcionarse.

Ya el mismo Schern utilizó carbón animal, pero los resultados no parecen tan claros ni satisfactorios. Kohn y Klemm utilizan el carbón, el carmín y el índigo. Estas nuevas técnicas han sido precisadas por los autores referidos, concretándose hoy:

a) *Método de Pien y Baise*: Se prepara una suspensión de índigo, así:

Indigo sintético	1 gr.
Caseína	1 "
Agua destilada	100 c. c.

Disolver la caseína, finamente pulverizada, en algunos c. c. de sosa N/10, con la cantidad suficiente para dar color rosa con la fenolftaleína. Completar con H₂O hasta 100 c. c. Triturar el índigo en un mortero con un poco de esta solución, para formar una pasta homogénea, que se incorporará lentamente con el resto del caseinato de sosa. Filtrar por algodón. Por el examen microscópico no deben observarse partículas de colorante, superiores a varias micras. Añadir 5 c. c. de solución de fenol al 5 por 100.

Se puede preparar también utilizando el índigo Lefranc que se emplea para la pintura al aguado. En este caso se toman 4 gramos de este preparado que se llevan a 100 c. c. con H₂O.

El ensayo se practica de la siguiente manera: Introducir 5 c. c. de leche y dos gotas de la solución de índigo, en un tubo de poco diámetro (15/15 ó 10/10). Agitar y dejar en reposo. A las dos horas, el anillo está claramente formado.

Colocando los tubos a 30° la reacción se acelera, pudiendo observarse a los 30 minutos. El anillo de colorante se forma en la capa de grasa, hacia su parte inferior, y en el fondo también se deposita parte del colorante. Esta es la reacción positiva. Cuando es negativa, es decir, cuando se trata de leche correctamente pasteurizada, el colorante se deposita íntegramente en el fondo de los tubos.

b) *Método de Tapernoux*: Prepárese una suspensión de carmín triturado al mortero, en agua destilada, al 1 por 100. En tubos de pequeño diámetro (como en el método anterior) se introducen 5 c. c. de leche a ensayar y 5 gotas de reactivo, medidas con pipeta normal. Agitar y colocar en un baño maría a 30°. Se debe considerar positiva toda reacción que presente anillo coloreado en el curso de los primeros 60 minutos.

Estas reacciones no tienen eficacia en las leches cuyo aguado excede el 10 por 100, por lo cual es imprescindible conocer este dato antes de formular un diagnóstico.

Las leches descremadas parcialmente presentan una reacción claramente retardada. Cuando el descremado es total, la reacción no se realiza. Asimismo las leches con acidez por encima de los 24° Dornic, tampoco dan reacciones aprovechables. Adviértase que en las leches sometidas a 67°, por tiempo inferior a 20 minutos se forman dos anillos: uno coloreado yuxtapuesto a otro blanco.

Referencias: Schern y Gorli, *Le Lait*, 1937, pág. 17. — Kohn y Klemur, *Le Lait*, 1937, pág. 19. — Tapernaux, *C. R. Soc. Biologie*, 16 octubre, 1933, pág. 649.

Kuhlmanu. — Propone una modificación del método de Schern-Gorli basada en el uso de glóbulos rojos de puerco espín.

A 2 c. c. de leche se pone 1 gota de suspensiones de glóbulos rojos de puerco espín diluidos en suero fisiológico al 0.9 por 100. Se mantiene la mezcla durante 2 a 3 horas a 37°. En la leche cruda aparece un anillo gris rojizo debajo de la capa de grasa. La ausencia de anillo y formación de precipitado rojo, indica que la leche ha sido calentada a más de 62°.

Referencia: *Le Lait*, junio 1936, pág. 655.

B. Leibovitch. — Modifica la preparación de la tintura de guayaco en vistas a modificar su sensibilidad mejorándola. Recomienda esta fórmula: disolver un gramo de resina de guayaco en 100 c. c. de aceitona, y añadir 0,5-1-3 gr. de guayacol cristalizado.

Modus operandi: Usar tubos de 15 c. c. de diámetro. Colocar 10 c. c. de leche y una gota de agua oxigenada a 3 volúmenes; mezclar y añadir 1 c. c. de tintura de guayaco. Agitar el tubo y observar la coloración de la capa superficial. Toda coloración azul que no es evidente a los 30 minutos puede darse por negativa.

Utilizando tintura con 3 gr. de guayacol, se descubre la presencia de leche cruda mezclada con la pasteurizada, en la proporción del 1 por 100.

Referencia: *Le Lait*, 1937, pág. 463.

Drost. — En los ensayos diastásicos de la leche se añade a cantidades iguales de leche cantidades variables de almidón, se incuban al baño maría y se añade una solución de yodo para determinar qué tasa de almidón produce todavía coloración azul.

Cuanto más elevada sea la temperatura a que fué sometida la leche, menos diastasa quedó activa y menos almidón será preciso para obtener el color azul. Los resultados del ensayo demuestran que este procedimiento no permite aclarar el grado de temperatura a que se sometió la leche, puesto que da los mismos resultados con leche calentada a 1 minuto a 70° que con leche sometida 15 minutos a 58-60°.

El ensayo de la ortotoluoldina se verifica añadiendo a 10 c. c. de leche 3 gotas de agua oxigenada al 3 por 100 y 5 gotas de solución de ortotoluoldina (2 gr. de orthot. 16 c. c. de ácido acético glacial y agua hasta 100 c. c.). Se aguardan 2 minutos.

Con la leche cruda aparece una coloración azul. Con leche calentada a 85° no se obtiene más que una coloración verde o nada. La misma reacción a la benzeidina permite descubrir sobre una leche, no ácida, un calentamiento rápido a 75° y hasta incluso a 70°. En cambio, no descubre el calentamiento a 63°-65°.

Referencia: *Molkerei Zeitg.*, vol. XLVII, 1933, pág. 187.

Scharadinger. — A 20 c. c. de leche añadir 1 c. c. de esta solución:

Solución alcohólica saturada de azul de metileno.	5 c. c.
Formol al 37 por 100	5 c. c.
H ₂ O	190 c. c.

Colocados los tubos al baño maría a 45°-50°, la leche cruda se decolora.

Referencia: *Zeitsch. Untersuch. Nahr. v. Genussin*, 1902, pág. 1113.

Storch. — A 5 c. c. de leche añadir: 2 gotas de una solución acuosa al 2 por 100 de p. fenilendiamina y 1 gota de peróxido de hidrógeno al 0,2 por 100. La leche cruda toma un color azul intenso. Cuando ha sido calentada a más de 80° no aparece coloración.

Tillman la modifica así: A 20 c. c. de leche añade un poco de polvo compuesto a partes iguales de p. fenil diamina y arena de mar, luego un poco de peróxido de bario y agita la mezcla. La leche cruda se torna verde e inmediatamente pasa a azul intenso.

Referencias: *Phärm. Zentralhalle*, 1898, pág. 617. — *Siegefled, Zeits. Angew. Chem.*, 1903, pág. 764. — *Nicolás, Bull. Soc. Chim.* 1911, pág. 266. — *Tillman, Zeitsch. Untersuch. Nahr. u. Genessu*, 1912, pág. 61.

Reacción de Storch. — Para efectuar esta reacción se colocan 5-10 c. c. de leche en una cápsula de porcelana de fondo plano; añadir dos gotas de agua destilada a 12 volúmenes y a continuación dos gotas de una solución acuosa al 2 por 100 de parafenilendiamina.

La oxidación da lugar a formarse una coloración azul intensa. Leches no hervidas. El reactivo ha de ser reciente o decolorado con carbón.

Reacción de Dupony. — Colocar 5 c. c. de leche en un tubo de ensayo, añadir dos gotas de agua oxigenada a 12 volúmenes y 5 c. c. de una solución acuosa al 1 por 100 de guayacol cristalizado.

Las leches crudas dan una coloración rojo salmón que desaparece lentamente. Algunas leches sólo dan la reacción calentándolas rápidamente al baño María a 40°.

Saul. — Mezclar 10 c. c. de leche con 1 c. c. de una solución recientemente preparada de sulfato de orto-metilamino fenol al 1 por 100 en agua; añadir una gota de peróxido de hidrógeno al 3 por 100.

En la leche cruda aparece una coloración roja, que dura aproximadamente un minuto. Las leches ácidas deben neutralizarse antes de proceder al ensayo. Este reactivo puede emplearse para descubrir la presencia de aldehido fórmico en la leche.

Referencia: *Brit. Med. Jour.*, 1903, pág. 664. 1907, pág. 429.

Schacht. — Esta prueba se basa en la coloración azul que se obtiene añadiendo a la leche unas gotas de tintura de guayaco.

Schern-Schell Hase recomienda añadir unas gotas de H_2O , después de la tintura de guayaco. Su sensibilidad se aumenta.

Referencias: *Arch. Pharm.*, 1848, pág. 3. — *Arnold y Weber, Milk. Zeit.*, 1902, pág. 657. — *Schern y Schell Hase, Berl. Tier. Wochens.*, 1911, pág. 868.

Carcano. — Calentar un poco de leche en una cápsula de porcelana, con unas gotas de esencia de trementina y un poco de tintura de guayaco. La leche hervida no se altera, mientras que la leche cruda se colorea de azul.

Referencia: *Boll. Chim. Farm.*, 1896, pág. 486.

Dupony. — La leche cruda a la que se añade peróxido de hidrógeno, se colorea de: amarillo anaranjado, con guayacol; rosa o amarillo, con hidroquinona al 10 por 100; amarillo pardo o azul, con pirocatequina al 10 por 100; azul violeta, con a-naftol; y violeta oscuro con p-fenilendiamina.

La leche hervida no se modifica.

Referencias: *Repert. de Pharm.*, 1897, pág. 296. — *Pharm. Zentralhalle*, 1903, página 514. — *La Wall, Amer. Jour. Pharm.*, 1909, pág. 81.

Eschaich. — Mezclar:

Piridina	...	1 c. c.
Sol. al 10 por 100 de aminopirina	...	1 c. c.
Leche	...	2 ó 3 gotas
Acido acético	...	10 ó 12 "

Una coloración violeta aparece en pocos segundos, cuando se trata de leche cruda.

Referencia: *Jour. Pharm. Chim.*, 1919, 20-49.

Gaucher. — Reactivo:

H_2O	...	20 c. c.
Hematina	...	0,2 gr.

A 20 c. c. de leche se añade 20 gotas del reactivo. Aparece un color rosado que agitando la mezcla desaparece si se trata de leche hervida, mientras que permanece si es cruda.

Referencia: *Ann. Chim. Anal. Chim. Appl.*, 1931, 13, 146.

Ladanj. — Una solución de cuajo, añadida a la leche, determina por la rapidez de coagulación, la calidad de la leche. El autor utiliza 10 c. c. de una solución al 1 por 100 de cuajo en polvo activo al 1/10.000 y 50 c. c. de leche, que coloca a 35°. Si se coagula antes de 3 minutos, es fresca. Si tarda de 3-10 minutos, es pasteurizada. Si no se coagula, es hervida.

Referencia: *Bull. Soc. Chim. Roy. Yougoslava.*, 1931, 2, 57.

Rochaix-Thévenou. — Acidular la leche (20 c. c.) con ácido acético, añadir un poco de sulfato de magnesia y agitar, para obtener la precipitación de la caseína. Filtrar.

Añadir a 2 c. c. del filtrado, 5 gotas de peróxido de hidrógeno al 3 por 100 y 3 c. c. de una solución al 4 por 100 de aminopirina. Calentar suavemente. La leche cruda presenta un color violeta que luego desaparece.

Referencia: *Jour. Pharm. Chim.*, 1909, pág. 573.

Bernstein. — A 50 c. c. de leche se añaden 4,5 c. c. de ácido acético. Filtrar, y calentar hasta ebullición el filtrado transparente. Si la leche no ha sido hervida o solamente calentada a 70° por poco tiempo, se obtiene un precipitado abundante de lacto albúmina.

Referencia: *Zeitschr. Fleisch-Milchhyg.*, 1900, pág. 135.

Bruése. — Prepara unas tabletas que contienen:

I — Guayacol, 0.05 gr. Lactosa, 0.20 gr.

II — Perborato sódico, 0.25.

A 10 c. c. de leche añádase: 1 tableta I, previamente desleída en 5 c. c. de agua. Agítense y añádase una tableta II.

La leche cruda se colorea de rojo salmón.

Referencia: *Jour. Pharm. Chim.*, 1906, pág. 488.

Arnold-Mentsel. — Reactivos: Solución alcohólica de p. dietil-p-fenilediámina, al 2-3 por 100 (a).

Solución alcohólica de p-diaminodifenilamina (clorhidrato) al 2-3 por 100 (b). Estas soluciones deben ser recientemente preparadas.

A 10 c. c. de leche añádase una tableta I, previamente desleída en 5 c. c. de agua. Agítense y añádase una tableta II.

Un 3 por 100 de leche cruda, añadida a la leche hervida, es suficiente para dar reacción.

Referencia: *Zeitschr. Untersuch. Nahr. u. Genussu.*, 6, 548.

Rothenfusser. = Reactivo:

Clorhidrato de p. fenilendiamina 1 gr.
Agua 15 c. c.

Disolver y mezclar a:

Guayacol cristalizado 2 gr.
Alcohol 185 c. c.

La leche con unas gotas de agua oxigenada, y unas gotas de reactivo, se colorea en azul-violeta, cuando es cruda.

Referencia: *Zeitschr. Untersuch. Nahr. v. Genussu.*, 1908, 16, 63.

Rubner. — Precipitar una cantidad de leche con exceso de cloruro sódico. Filtrar. Tomar un poco de filtrado en un tubo, y calentar hasta ebullición.

La coagulación de la albúmina indica que la leche no ha sido hervida.

Referencia: *Hvg. Rundschau*, 1895, pág. 1021.

Balaz (Wilburn-Tanner). — A 5 c. c. de leche añadir 2 c. c. de una solución de sulfato de cobre (69, 26 gr. por litro de H_2O). Agitar y filtrar. Al filtrado añadir 5 gotas del reactivo de Adam-Kiewich (ác-

do sulfúrico una parte, ácido acético dos partes). Calentar y dejar en reposo. La leche cruda se colorea en violeta.

Frost (1915). — A 5 partes de leche, añadir 1 parte de solución acuosa de azul de metileno al 7 por 100. Dejar la mezcla de 15 a 30 minutos en contacto. Centrifugar y extender el sedimento sobre portas bien secos y desgrasados.

Leche cruda: campo uniformemente azul, con manchas de grasa y leucocitos que no se han teñido. Leche calentada: los núcleos de los leucocitos aparecen fuertemente coloreados de azul.

Frost-Ravenel. — Centrifugar 15 c. c. de leche durante 5 minutos y se separa el líquido hasta que sólo quede un par de milímetros sobre el sedimento.

Tirar unas gotas de solución acuosa de safranina, disgregando el sedimento con una varilla fina, hasta color rosa uniforme. Dejar en contacto durante 3 minutos y extender sobre el porta bien limpio. La leche que no ha sido calentada más allá de 63°, presenta los polinucleares destejidos.

E. Hekura. — Filtrar la leche por algodón. Mezclar a 5 c. c. de leche, 5 c. c. de una solución de tripan-azul al 15 por 100 en agua fisiológica. Dejar en reposo 15 minutos. Centrifugar a 2.000 revoluciones durante 20 minutos. Con el sedimento hacer preparaciones finas. Secar. Leche cruda: las células son grandes y decoloradas. Leche calentada a más de 70°, células deformadas y núcleos teñidos.

A 63° la tinción no es fuerte, pero visible. Se pueden identificar mezclas de leches.

Arnold. — A una cantidad prudencial de leche añadir lentamente unas gotas de tintura de guayaco. Si la leche no ha sido calentada más allá de 80° se forma una zona azul. Con la leche cruda no pasa nada.

Es preferible utilizar un reactivo viejo. Se conserva durante mucho tiempo.

Pitarelli. — A 10 c. c. de leche añadir 2 gotas de cada uno de los tres reactivos siguientes: solución al 1 por 100 de clorhidrato de parafenildiamina, solución saturada de benzofenol, y agua oxigenada al 1 por 100. Si se produce inmediatamente una coloración violeta, la muestra está constituida por leche cruda o por parte de ella.

Entonces se diluye 1 c. c. de la muestra con 399 c. c. de agua y se repite el ensayo. Si la coloración todavía aparece, aunque con retraso, la leche es positivamente cruda. Si la coloración no se presenta, se trata de leche mezclada en tal proporción que la sensibilidad ha desaparecido. Para determinar la posible proporción se repite el ensayo a menores diluciones hasta obtener una positividad.

La dilución que da el tono apetecido, multiplicada por 4, da la proporción de la mezcla buscada.

Referencias: *Ann. Higiene*, vol. XLIII, 1933, pág., 864. — *Le Lait*, enero 1936, página 42.