

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



Determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos y Tetraciclinas en leche cruda de cinco ganaderías ubicadas en el Municipio de San Luis Talpa y en leche pasteurizada.

POR

BR. ANA MIRIAM BARRERA MÉNDEZ

BR. ERICK MAURICIO ORTEZ PÉREZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, JULIO DE 2012.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA



Determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos y Tetraciclinas en leche cruda de cinco ganaderías ubicadas en el Municipio de San Luis Talpa y en leche pasteurizada.

POR

BR. ANA MIRIAM BARRERA MÉNDEZ

BR. ERICK MAURICIO ORTEZ PÉREZ

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

LICENCIADO (A) EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, JULIO DE 2012.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

Ing. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

Dra. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO

Ing. Agr. Msc. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA

SECRETARIO

Ing. Agr. Msc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA

F. _____

MVZ. MARÍA JOSÉ VARGAS ARTIGA

DOCENTES DIRECTORES

F. _____

MSc. AMY ELIETH MORÁN RODRIGUEZ

F. _____

MVZ. OSCAR LUIS MELÉNDEZ CALDERÓN

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACION

F. _____

MVZ. OSCAR LUIS MELENDEZ CALDERON

RESUMEN

Esta investigación consistió en la determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en muestras de leche cruda provenientes de cinco ganaderías del municipio de San Luis Talpa y leche pasteurizada de dos empresas procesadoras nacionales.

La determinación se realizó por medio de un análisis microbiológico basado en el Manual de Análisis Bacteriológico, BAM, el cual consistió en la siembra de las muestras de leche en medios de cultivo especiales en los que se observan halos de inhibición, en el crecimiento de bacterias específicas, las cuales indican la cantidad de antibiótico presente.

Los resultados que se obtuvieron fueron comparados con los establecidos por el Codex Alimentarius. El análisis de tetraciclinas mostró que de las 25 muestras de leche cruda, solamente tres estaban por debajo del valor establecido ($100\mu\text{g/L}$); mientras que las leches procesadas mostraban valores muy superiores que iban desde $449\mu\text{g/L}$ hasta $8649\mu\text{g/L}$. Por otra parte, en el análisis de β -lactámicos las 25 muestras de leche cruda superaron el valor establecido ($4\mu\text{g/L}$) y las muestras de leche pasteurizada registraron valores mucho mayores que iban desde $546\mu\text{g/L}$ hasta $1740\mu\text{g/L}$.

Se interpreta que las ganaderías muestreadas no están cumpliendo con los períodos de retiro de los antibióticos además que posiblemente se estén utilizando de forma indiscriminada, por tanto, existen residuos de antibióticos en la leche que producen. De igual forma se demuestra que los procesos de pasteurización que las empresas estudiadas emplean, no eliminan residuos de antibióticos en una manera eficaz.

Se concluye que tanto las leches crudas, como pasteurizadas presentaron niveles superiores a los permitidos por la norma, lo cual representa un riesgo a la salud de los consumidores debido a los múltiples efectos nocivos que éstos fármacos pueden producir al ser ingeridos en pequeñas dosis constantemente, tales como resistencia de cepas bacterianas, procesos alérgicos y alteraciones digestivas, entre otras.

Palabras clave: leche, cruda, pasteurizada, residuos, antibióticos.

AGRADECIMIENTOS

- A LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR Por la formación que nos ha dado.
- A NUESTROS DOCENTES DIRECTORES MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez
MVZ Oscar Luis Meléndez Calderón
Por el apoyo y las enseñanzas que
nos brindaron a lo largo de este
proceso.
- A CENSALUD Por brindarnos asesoría,
infraestructura y equipo necesario para
la realización de las pruebas de
laboratorio.
- SEÑORES GANADEROS Por permitirnos realizar esta
investigación en sus explotaciones
pecuarias.
- A Don Aquilino Por su colaboración en la fase de
muestreo.
- A Don Juan Por su paciencia y apoyo en el
laboratorio.
- Al Ing. Mario Bermúdez Por su asesoría en el procesamiento
de datos.
- A Doris Por su colaboración y buen trato.
- Y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la realización de este
proyecto.

Ana Miriam Barrera Méndez

Erick Mauricio Ortez Pérez

DEDICATORIA

A DIOS

Por lo maravillosos de su creación y los milagros que realiza cada día.

A MIS PADRES

Ada Eleticia Pérez Molina.

Juan Ángel Ortez Alvarenga.

Por darme la vida, por guiarme, por prepararme y por siempre estar ahí cuando los he necesitado.

A MIS HERMANOS

Verónica Leticia Espinoza Pérez.

Pedro José Espinoza Pérez.

Francisco Antonio Pérez.

Por su apoyo y ayuda en distintos momentos de mi carrera.

A MI COMPAÑERA DE TESIS

Ana Miriam Barrera Méndez, por ayudarme tanto y tantas veces en la realización de ésta investigación, y por ser una de las personas más importantes en mi vida.

Erick Mauricio Ortez Pérez.

DEDICATORIA

A DIOS

Por permitirme terminar mis estudios y haberme respaldado cada día de esfuerzo y dedicación a pesar del cansancio y de las adversidades. *“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas” Josué 1: 9.*

A MIS PADRES

Ana Miriam Méndez de Barrera, por traerme al mundo, ser mí mejor amiga y consejera, además de cuidarme, protegerme y apoyarme en todas mis decisiones.

Carlos Antonio Barrera, por ser un padre cariñoso, comprensivo y esforzado.

Gracias por tener confianza en mí y enseñarme el camino del bien.

A MIS HERMANOS

Carlos José, por ser un ejemplo de esfuerzo y bondad, además de compartir noches de desvelo y estudio, dándonos apoyo mutuamente.

Carlos Andrés, por ser tan sincero y por confiar en mí, gracias por tus consejos y por estar pendiente cada vez que te necesité.

A MI COMPAÑERO DE TESIS

Erick Mauricio Ortez Pérez, por ser mi mejor amigo y estar en cada momento bueno y malo desde hace tantos años, por apoyarme, ayudarme y comprenderme cada vez que fuera necesario y por muchas cosas más... Gracias!

A mi Tia Chaito, que siempre me ha brindado un ejemplo de lucha, junto con su cariño y cuidados.

Ana Miriam Barrera Méndez

INDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIAS	vi
INDICE GENERAL	viii
INDICE DE ANEXOS	xi
INDICE DE CUADROS	xii
INDICE DE FIGURAS	xiii
ABREVIATURAS	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Antecedentes en países de la región	4
2.2. Concepto de residuos de antibióticos en leche	6
2.3. Contaminación de la leche por antibióticos	7
2.4. Importancia de residuos de antibióticos en la Salud Pública	8
2.5. Importancia de residuos de antibióticos en Salud Animal	10
2.6. Importancia de residuos de antibióticos en la Industria Láctea	10
2.7. Termoestabilidad de los antibióticos en leche y período de retiro del ordeño	11
2.8. Normativas para los residuos de antibióticos en leche	12
2.9. Período de retiro	14

2.10. Manejo y uso racional de antibióticos en ganado lechero	14
2.11. Factores de variación de la presencia de residuos de antibiótico en leche	15
2.12. Métodos de Detección de residuos de antibióticos en leche	16
2.12.1. Métodos microbiológicos para detección de residuos antibióticos en leche	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Descripción del estudio	19
3.2. Materiales, Equipos, Reactivos, Medios de cultivo y Cultivos bacterianos	19
3.3. Metodología de Campo	21
3.4. Metodología de Laboratorio	22
3.4.1. Preparación y reconstitución de medios	23
3.4.2. Preparación del Inóculo	23
3.4.3. Preparación de las Placas Petri	24
3.4.4. Preparación de la Curva Estándar	24
3.4.5. Preparación de la Muestra	25
3.4.6. Cálculo de potencia	26
3.4.7. Controles	26
3.5. Metodología Estadística	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	28
4.1. Resultados de las encuestas realizadas en las Ganaderías	28
4.2. Resultados de la determinación de Tetraciclina en leche	30
4.3. Resultados de la determinación de β -lactámicos en leche	33

5. CONCLUSIONES	36
6. RECOMENDACIONES	37
7. BIBLIOGRAFÍA	38
8. ANEXOS	43

INDICE DE ANEXOS

Contenido	Página
Anexo A – 1. Encuesta para las explotaciones pecuarias	44
Anexo A – 2. Preparación de reactivos	46
Anexo A – 3. Esquema de dilución para β -lactámicos	48
Anexo A – 4. Esquema de dilución para Tetraciclina	49

INDICE DE CUADROS

Contenido	Página
Cuadro A – 1. Termoestabilidad y tiempo de eliminación de antibióticos	50
Cuadro A – 2. Límites máximos permitidos para antibióticos en leche	50
Cuadro A – 3. Ingesta Diaria admisible de residuos de antibióticos en leche	51
Cuadro A – 4. Tiempos de eliminación de antibióticos en el cuarto tratado	51
Cuadro A – 5. Valores a los que se les aplicó transformación logarítmica (Tetraciclinas)	52
Cuadro A – 6. Valores transformados y multiplicados por el factor (100) (Tetraciclinas)	52
Cuadro A – 7. Valores a los que se les aplicó transformación logarítmica (β -lactámicos)	53
Cuadro A – 8. Valores transformados y multiplicados por el factor (10) (β -lactámicos)	53

INDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura A – 1. Mapa del Departamento de La Paz (San Luis Talpa)	54
Figura A – 2. Ganadería A	55
Figura A – 3. Ganadería B	55
Figura A – 4. Ganadería C	55
Figura A – 5. Ganadería D	56
Figura A – 6. Ganadería E	56
Figura A – 7. Paquetes de Cristalería Estéril	56
Figura A – 8. Preparación del Inóculo	57
Figura A – 9. Recolección del inóculo de la Botella de Roux	57
Figura A – 10. Material para preparación de diluciones de Solución Stock	57
Figura A – 11. Diluciones para Curva Estándar	58
Figura A – 12. Curva Estándar para β -lactámicos	58
Figura A – 13. Muestras de leche provenientes de las Ganaderías	59
Figura A – 14. Placas con muestras de leche de Ganaderías	59
Figura A – 15. Medición de halos de inhibición	59
Figura A – 16. Preparación del <i>Micrococcus luteus</i> o <i>Staphylococcus aureus</i>	60
Figura A – 17. Preparación de Placas Petri	61
Figura A – 18. Preparación de las diluciones para la curva estándar	62
Figura A – 19. Preparación de las placas Petri para la curva estándar	63

Figura A – 20. Preparación de la muestra	64
Figura A – 21. Calculo de potencia	64
Figura A – 22. Hoja de Cálculo: Diámetros de halos de inhibición Curva Estándar β -lactámicos	65
Figura A – 23. Hoja de Cálculo: Diámetros de halos de inhibición de Muestras de Leche Cruda	66
Figura A – 24. Hoja de Cálculo: Corrección de estándares β -lactámicos	67
Figura A – 25. Hoja de Cálculo: Concentración Media del estándar, L y H	68
Figura A – 26. Gráfico: Curva Estándar y Muestras de Leche Cruda β -lactámicos	69
Figura A – 27. Distribución para t de Student	70

ABREVIATURAS

BAM: Manual de Análisis Bacteriológico.

CENSALUD: Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.

CONACYT: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

FAO: Organización para la Alimentación y la Agricultura.

FDA: Administración de Drogas y Alimentos.

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

IDA: Ingesta Diaria Admisible.

IDF: Federación Internacional de Leche.

JECFA: Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios.

LMR: Límite Máximo de Residuos.

NSO: Norma Salvadoreña Obligatoria.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

TRAM: Tiempo de Reducción de Azul de Metileno.

UHT: Ultrapasteurización.

UI: Unidad Internacional.

1. INTRODUCCION

El uso de antibióticos es una práctica frecuente para el control y prevención de enfermedades infecciosas en las ganaderías lecheras de nuestro medio; sin embargo en la gran mayoría de ocasiones, suelen utilizarse sin tener la asesoría de un profesional idóneo, por lo cual son utilizados de manera inadecuada empleando subdosificación o sobredosificación, número de aplicaciones, duración del tratamiento y vías de administración incorrectas.

Entre los antibióticos comúnmente utilizados en el medio se encuentran los β -lactámicos y Tetraciclinas por ser fáciles de adquirir, económicos, amplio espectro de acción y ampliamente conocidos por los ganaderos.

Los antibióticos β -lactámicos, se usan generalmente en el tratamiento de mastitis, procesos piógenos, carbón sintomático, edema maligno, hemoglobinuria bacilar, tétano, pielonefritis, leptospirosis, listeriosis, entre otras. En el caso de las tetraciclinas, se suelen utilizar en infecciones sistémicas como las respiratorias, entéricas, casos de metritis, mastitis, anaplasmosis, leptospirosis, poliartritis infecciosa, pierna negra y otras.

Entre los factores más importantes de ésta problemática tenemos el irrespeto a los tiempos de retiro de estos fármacos en la leche. Éste período, es el tiempo en el cual los antibióticos siguen siendo excretados a través de la leche en cantidades que son potencialmente peligrosas si son consumidas por las personas. El irrespeto al tiempo de retiro se da por razones como el desconocimiento de su existencia, la ignorancia de los efectos que su irrespeto puede ocasionar, la pérdida económica que representa al productor el deshacerse de la leche contaminada, entre otras.

La existencia de residuos de antimicrobianos en leche cruda, representa un problema muy complejo ya que éstas abastecen a las empresas procesadoras que posteriormente la comercializan para ser adquiridas por los consumidores y en algunos casos, son las propias ganaderías quienes la venden al consumidor final.

Las plantas procesadoras que utilizan la pasteurización tendrán una mayor cantidad de residuos de antibióticos en su producto final, ya que dicho procesamiento solo elimina el 8% de la actividad de la penicilina y no se tiene datos de que inactive o elimine a las Tetraciclinas, en comparación con las que utilizan UHT, cuyo procesamiento se sabe es más efectivo en la eliminación parcial de residuos de antibióticos (Amiot J. 1991).

Ante la falta de estudios efectuados en el país se hace importante la realización de ésta investigación, la cual persigue determinar residuos de antibióticos β -lactámicos y Tetraciclinas en muestras de leche cruda y pasteurizada.

Debido a que la leche es uno de los alimentos que consume la población del país, es importante el hecho que se encuentre libre de agentes químicos extraños a su composición, como antibióticos, utilizados comúnmente en la medicina veterinaria.

La existencia de residuos de antibióticos en la leche disponible para el consumo humano es un problema con amplias repercusiones en la salud pública, a pesar que generalmente las cantidades presentes en la leche son relativamente bajas, éstas constituyen un potencial peligro ya que si son consumidas constantemente pueden llegar a provocar distintas alteraciones a la salud, tales como la sensibilización producida por una ingestión repetida de pequeñas dosis, procesos alérgicos en las personas, que en casos extremos llevarán a anafilaxia y provocan perturbaciones pasajeras en la flora intestinal, así mismo, reacciones de intoxicación frente a determinados antibióticos de gran toxicidad (Jacquet y Auxepaules, 1978; Oda y Hiwaki, 1996).

El uso indiscriminado de antibióticos en el hato lechero es un problema que afecta directamente la seguridad alimentaria del país, debido a que si las vacas tratadas siguen siendo productoras indistintamente, la leche de las mismas contendrá agentes extraños a su composición normal, en éste caso antibióticos; por lo cual la ganadería no se estará proveyendo un producto inocuo. De igual forma la aplicación continua de antibióticos, hace que éstos fármacos pierdan eficacia a lo largo del tiempo, lo que conlleva a la baja en la producción en vacas que cursen enfermedades infecciosas, disminuyendo por tanto la producción en la ganadería.

Por tanto la investigación pretende realizar una contribución a la protección del consumidor al determinar si el producto final disponible se encuentra libre de residuos de antibióticos que puedan llegar a afectar su salud.

El objetivo principal de la investigación es determinar la existencia de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en muestras de leche fresca procedente de 5 ganaderías y de leche pasteurizada disponible en supermercados mediante un análisis microbiológico, así como la cuantificación de los residuos de ambas sustancias, evaluación de la existencia de altas cantidades de residuos en leche, en las propiedades donde se registro mayor índice de enfermedades infecciosas.

Entre los alcances del trabajo está la detección de residuos de antibióticos β -lactámicos y Tetraciclinas en muestras de leche cruda producidas en cinco ganaderías, verificando si éstas cumplen o no con el tiempo de retiro de los fármacos en sus vacas en producción.

Al encontrar antibióticos en las muestras de leche procesadas se cuantificaron y se compararon los resultados en las distintas muestras obtenidas, así como también se compararon con los resultados obtenidos en las ganaderías. A partir de los resultados obtenidos en la leche procesada se realiza un aporte a la salud pública del país concluyendo que la ingesta continua de las mismas puede resultar perjudicial para la salud del consumidor, debido a la presencia de residuos de antimicrobianos encontrados durante la investigación. Tomando como base los hallazgos obtenidos tanto en las ganaderías como en la leche procesada, se realizaron las recomendaciones pertinentes para que los productores hagan uso racional de los antibióticos y se evite la contaminación de la leche producida. Además, se proponen medidas que se pueden implementar por las autoridades competentes para que la leche que se produce en el medio no esté contaminada con éstas sustancias.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Antecedentes en países de la región.

En las explotaciones ganaderas de leche, constantemente se utilizan productos destinados a mantener en buen estado de salud al hato, especialmente los que se encuentran en producción, ya que si los animales enferman, conlleva a pérdidas económicas, por tales razones se hace uso de distintos antibióticos. Sin embargo, al aplicarlos por cualquier vía, se debe cumplir el período de retiro correspondiente a cada producto, para evitar que los residuos de dichos fármacos excretados en la leche, sean mezclados con el resto procedente de vacas sanas y sea destinado al consumo humano, además de limpiar todos los utensilios y maquinaria que haya estado en contacto con leche, de esta forma se evitan problemas en salud pública y en la industria (Alderete, A. 2009).

Debido a que no existen estudios previos sobre la presencia de residuos de antibióticos en leche cruda y pasteurizada en nuestro país, se presentan a continuación algunas investigaciones realizadas en la región.

Estudio realizado en Costa Rica en el año 2000, se analizó residuos de penicilina en 100 muestras de leche pasteurizada de marcas comerciales y 155 muestras de leche cruda de las regiones lecheras de dicho país, empleando el método de difusión en agar utilizando discos de papel impregnados con *Bacillus Subtilis* para procesar las muestras, obteniendo como resultado el 88% de las muestras de leche comercial y el 64.5% de la leche cruda positiva a la presencia de residuos de penicilina (Arias et al. 2000?).

En otra investigación realizada en Perú en el año 2002 en la leche fresca consumida por la población de Cajamarca, se obtuvieron muestras de mercados, tiendas y algunos fundos de dicha ciudad, para luego ser procesadas por dos métodos cualitativos y determinar la presencia de residuos de antibióticos, se usó el cultivo de la cepa *Stearothermophilus* y la prueba de difusión estándar Delvotest, trabajando 216 muestras en un período de tres meses, los resultados obtenidos positivos a la presencia de antibióticos fueron de 20.67% de las muestras procedentes de los mercados y 21.21% de las muestras de tiendas y fundos, siendo un promedio de 20.83% de muestras contaminadas con dichos residuos (Llanos, GA. 2002).

La investigación realizada en el año 2002 en Zulia, Venezuela, en leche comercial de 8 marcas diferentes, se analizaron 104 muestras para determinar la presencia de Penicilina

G en leche pasteurizada, utilizando el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, obteniendo 1 muestra (0,96%) positiva a la presencia de Penicilina G, a concentración de 0,95 ppm (Allara et al. 2002).

Otro estudio realizado en Perú en el año 2009 en la población del Callao, consistió en el análisis de la leche cruda para determinar residuos de β -lactámicos y tetraciclinas, para esto, se analizaron 40 muestras de leche cruda comercializada en mercados de dicha región durante un período de tres meses, utilizando un método cualitativo a través de un Kit Snap basado en colorimetría, el cual cumple con los límites de sensibilidad establecidos por la FDA, obteniendo como resultado 40% de las muestras positivas a residuos de β -lactámicos y no se lograron detectar resultados positivos al analizar las tetraciclinas (Guerrero et al. 2009).

Por otro lado, se realizó un estudio en México en el año 2009, evaluando la presencia de residuos de antibióticos y quimioterapéuticos en la leche en el estado de Jalisco, utilizando muestras de leche cruda y pasteurizada de dicho estado por período de un año. Las 264 muestras fueron analizadas con una combinación de métodos, como método de selección se empleó la prueba del yogurt, por tanto las muestras positivas fueron sometidas a un kit colorimétrico, Twin Sensor, para la detección de β -lactámicos y tetraciclinas, y a Cromatografía Líquida de Alta Resolución para detectar sulfonamidas, cloranfenicol y nitrofuranos. En la prueba del yogurt resultó el 9.8% de contaminación total; en la leche pasteurizada 13.8% de las muestras resultaron ser positivas, de las cuales 6 muestras contenían β -lactámicos y 2 muestras tetraciclinas; en la leche cruda 3 contenían β -lactámicos y 3 tetraciclinas, el 77% de las muestras positivas al menos contenía una sulfonamida y no se encontraron muestras positivas a nitrofuranos ni cloranfenicol (Noa et al. 2010).

La investigación realizada en Perú, en el mercado del Callao en el año 2009, detectó la presencia de residuos de antibióticos β -lactámicos y de tetraciclinas en muestras de leche cruda, leche UHT y leche esterilizada envasada, para esto, se empleó el Snap IDEXX como método presuntivo, obteniendo como resultado la obtención de 41.66% de muestras positivas a la presencia de residuos β -lactámicos en leche cruda, en leche UHT no se obtuvieron resultados positivos en ninguna de las muestras estudiadas y en la leche esterilizada envasada se encontró 66.66% de resultados positivos; no se detectaron

residuos de tetraciclinas en ninguna de las muestras de leche evaluadas (Reyna, GE. 2009).

En el valle de México, algunos trabajos científicos realizaron en el año 2010, reportan que de 125 muestras de leche de diferentes marcas, resultaron libres de residuos de antibióticos sólo 9.6% y ocho muestras de leche para bebé analizadas dieron positivas a uno o dos de los antibióticos estudiados (penicilina, estreptomicina y tetraciclina). Además existe referencia científica de encontrar frecuencia del 50% de residuos de antibióticos en 102 muestras de leche, realizadas en cuatro marcas comerciales de leche pasteurizada de mayor consumo en la ciudad de México (UAM. 2010).

Otro estudio realizado en México en el año 2010, en la región de Tierra Caliente, donde se produce anualmente 11.9 millones de litros de leche. En este caso se analizaron 129 muestras de leche cruda con el Kit comercial Delvotest sp basado en colorimetría para la detección de residuos de antibióticos, encontrando positivo el 18.60% de las muestras obtenidas (Camacho, LM. 2010).

Debido a lo antes mencionado, aún cuando la frecuencia y variabilidad es diferente entre países, los residuos de antibióticos en leche son un problema trascendental causado por el abuso de la aplicación de fármacos y la falta de programas de inspección adecuados.

2.2. Concepto de residuos de antibióticos en leche

Cuando existe presencia de concentraciones de antibióticos en leche que son superiores a las permitidas por normas sanitarias establecidas, son denominados como residuos, concentraciones residuales o inhibidores y estos pueden ser detectadas por métodos químicos, químico-físicos o microbiológicos, realizadas con el fin de proteger la salud o de evitar problemas en los procesos de industrialización láctea. La leche que contienen concentraciones residuales de algún antibiótico, corresponden a vacas que han recibido tratamiento por distintas vías, tanto a nivel sistémico como local (CONACYT. 2010).

2.3. Contaminación de la leche por antibióticos.

Los residuos más comunes y conocidos en productos de origen animal son los procedentes de medicamentos antibióticos que se emplean con fines profilácticos y terapéuticos, los cuales se han ido estudiado con mayor interés, puesto que ha sido necesario establecer un criterio muy estricto en cuanto al límite máximo de residuos, resultante de la utilización de un principio activo utilizado en un medicamento veterinario independientemente de los excipientes que lo acompañe, considerando la posible ingesta a través de alimentos contaminados y por tratamientos específicos para la erradicación de enfermedades en los humanos (Instituto Lactológico de Lekunberri. 2004).

El uso de antibióticos en las explotaciones ganaderas es una realidad y una necesidad, sin embargo, al aplicar tales fármacos se debe contar con una dosis, vía de administración, período de retiro adecuado y apropiada identificación de vacas en tratamiento para evitar contaminación accidental de la leche procedente de vacas sanas, además se debe identificar el motivo principal para usarlos y tomar las medidas adecuadas para disminuir el uso de éstos (Engebretson, D. 2010).

El uso excesivo e inapropiado de los antibióticos, ha logrado el aumento de microorganismos resistentes, los cuales han adquirido la capacidad para resistir los efectos de determinado fármaco ante el cual eran susceptibles, debido a esto, es importante que se apliquen buenas practicas agrícolas, veterinarias, de alimentación animal, así como de higiene en las explotaciones lecheras, para evitar la presencia de residuos de fármacos en la leche (Reyes, BR. 2006).

Una de las razones más comunes de administrar antibióticos en una explotación lechera es la ocurrencia de casos de mastitis, la cual generalmente es tratada de forma fácil, rápida y barata con la aplicación intramamaria de antibióticos β -lactámicos. Sin embargo, de la dosis administrada, una parte es absorbida por el cuerpo y pasa al torrente sanguíneo, otra parte es inactivada por la leche y los productos generados por la infección y el resto, que es la mayor parte, es excretada en la leche durante los ordeños siguientes, siendo los animales de baja producción los que se tardan más en eliminar el fármaco; por tanto, el ordeño frecuente ayuda a diluir el antibiótico y acorta el tiempo de eliminación del mismo, además debe tenerse en cuenta que no sólo se contamina la leche de los cuartos tratados sino también la leche producida por los cuartos vecinos, posiblemente por difusión pasiva entre la sangre y la leche y también entre el tejido mamario (Magariños, H. 2000).

En el caso de las enfermedades o infecciones sistémicas, como las respiratorias, entéricas, casos de metritis o presencia de anaplasmosis, entre otras, se usa como antibiótico de elección algún derivado de la tetraciclina, por ser fácil de conseguir, aplicar y de precio accesible, siendo el mayor problema el uso de dosis inadecuadas, deficiente período de retiro y la falta de consulta con el médico veterinario, las tetraciclinas por ser generalmente aplicados de forma sistémica, son distribuidos a todo el cuerpo y por tanto excretados de distintas maneras, siendo la leche una de éstas, en la cual se puede encontrar aproximadamente la mitad de la concentración respecto a la cifra plasmática (Sumano, H y Ocampo, L. 1997).

Debido a que la existencia de límites máximos permitidos de residuos de antibióticos en la leche no proporciona una solución al problema, se debe hacer uso racional de los mismos, tanto en dosis como en vías de administración, además de un adecuado manejo, seleccionar ganado con buena genética y sobre todo utilizar medidas que disminuyan la incidencia de mastitis (Magariños, H. 2000).

2.4. Importancia de residuos de antibióticos en la Salud Pública

Los residuos de antibióticos en leche son perjudiciales tanto para la salud pública como para algunos procesos de la industria láctica. Al ingerir alimentos contaminados con residuos de antibióticos representan un peligro para la salud, porque éstos son capaces de producir una toxicidad de tipo crónica, causar reacciones alérgicas de distintas magnitudes, efectos carcinogénicos, pueden estimularse bacterias antibiótico resistentes y en consecuencia el desarrollo de microorganismos patógenos, además puede causar la reducción de la síntesis de vitaminas; por otro lado, pueden presentarse irritaciones digestivas, entre otras (Brunton, L. 2007).

La resistencia bacteriana podría llegar a considerarse también como un problema ecológico, ya que cepas que son resistentes a algunos antibióticos no afectan solamente a las personas que están siendo tratadas, sino a otros individuos que comparten el ambiente con éstas, además muchas bacterias resistentes pueden pasar de animales a humanos y viceversa, lo cual hace difícil el tratamiento de infecciones en ambos, tomando en cuenta que todas las bacterias de un organismo son afectadas cuando se implementa un tratamiento a base de antibióticos (COPROICA. 2003).

En el caso de ingerir leche con residuos de antibióticos β -lactámicos pueden provocar reacciones adversas como erupciones maculopapulares, urticaria, fiebre, broncoespasmo, vasculitis, dermatitis exfoliativa y anafilaxia en distintos grados, pudiendo causar graves reacciones en personas hipersensibles tan solo con ingerir 40 UI de algún tipo de penicilina. Al consumir leche contaminada con residuos de tetraciclinas pueden provocarse reacciones adversas como dolor epigástrico y abdominal, náuseas, vómitos, diarreas; en personas hipersensibles al antibiótico se puede presentar fotosensibilidad por exposición cutánea al sol, en lactantes prematuros o niños en estado de desarrollo óseo y dentario acelerado, puede causar alteraciones y disminución del crecimiento óseo, por sus propiedades quelantes de calcio y otros cationes, formando compuestos estables que interfieren en la osificación y dentición normal, sin embargo, esta situación no parece ser un fenómeno frecuente y puede ser reversible si la exposición fue durante poco tiempo (Brunton, L. 2007).

La resistencia a los antibióticos se manifiesta debido al aumento de casos dichos fármacos eran eficaces para un tratamiento y dejan de responder repentinamente de forma adecuada respecto a experiencias clínicas anteriores, es decir, algunos microorganismos adquieren resistencia múltiple al ser sometidos a bajas concentraciones de antibióticos, la posibilidad de inducir resistencia bacteriana tiene relación con la gran diversidad bacteriana que contacta con numerosos antibióticos y la habilidad de adquirir y transferir esta resistencia (Prado *et al.* 2002).

Por otro lado, la disbacteriosis consiste en eliminar las bacterias benéficas, de presencia deseable en el tubo digestivo, pueden producir dolor y picor en la boca y lengua, además de diarrea entre otros síntomas, además, pueden presentarse sobrecrecimientos, ya que algunos antibióticos son capaces de eliminar algunas bacterias pero hacen crecer otras e incluso otros microorganismos indeseables como los hongos (Instituto Lactológico de Lekunberri. 2004).

Se debe tener en especial consideración a las poblaciones más susceptibles, tales como los infantes, los adultos mayores y mujeres embarazadas, ya que generalmente dichos grupos de personas son grandes consumidores de productos lácteos, por tanto, en caso de ser expuestos continuamente a residuos de antibióticos pueden perder sensibilidad ante éstos (Balbero, JE y Balbero, VI. 2006).

2.5. Importancia de residuos de antibióticos en Salud Animal

Debe tenerse en cuenta que cuando se habla de salud animal no se puede excluir los riesgos que implica que los animales consuman leche con residuos de antibióticos en concentraciones mayores a las permitidas por los organismos regulatorios, ya que si esta leche, se descarta y es suministrada a animales en período de lactancia, existe un riesgo potencial muy alto de inducir resistencia bacteriana a patógenos comunes tanto en humanos como en animales, ya que al estar ingiriendo dosis subterapéuticas de forma prolongada, disminuye la eficacia de los fármacos administrados en dosis terapéuticas al presentarse una necesidad real. Es por ello que no es adecuado nutrir a lactantes, terneros especialmente, con leche de alto contenido antibióticos (Zurich, L y San Martín, B. 2004).

2.6. Importancia de residuos de antibióticos en la Industria Láctea

Por otro lado, los problemas relacionados a la industria láctea están directamente relacionados a la pérdida de la calidad de la leche, afectando mayormente a los productos fermentados, fabricación y maduración del queso; los residuos de antibiótico por tanto, provocan demora en la acidificación y coagulación, siendo ésta última deficiente; además hay disminución de la retención de agua, se puede dar el desarrollo de microorganismos indeseables y alteración de las características normales del producto, tales como cuerpo débil, textura blanda, sabor amargo y consistencia arenosa, además, reduce la producción normal de acidez y aroma durante la fabricación de la mantequilla y el yogurt (Magariños, H. 2000).

La inhibición de bacterias que participan en los procesos de obtención de derivados de leche, queso, crema, yogurt y otros, es una consecuencia de la presencia de residuos de antibióticos, produciendo pérdidas para la industria, además la tendencia del uso de antibióticos de larga acción sin prescripción medica favorece la supervivencia del problema (Zurich, L y San Martín, B. 2004).

Las bacterias utilizadas en procesos de industrialización de la leche, por efecto de los antibióticos, presentan cambios morfológicos y pueden darse casos en que los cultivos iniciadores sean reemplazados por microorganismos indeseables, provocando la inutilización del producto o convirtiéndose en peligroso para consumo humano. Por ejemplo las bacterias utilizadas en la fabricación de yogurt, tales como, *L. bulgaricus* y

Strep. Thermophilus resultan ser de las más sensibles a los antibióticos. Además la industria se ve perjudicada en pruebas de control de calidad, como por ejemplo, en la prueba de tiempo de reducción del azul de metileno, aumenta cuando la leche está contaminada con antibióticos, clasificando la leche de forma errónea. (Magariños, H. 2000).

Los estreptococos mesófilos lácticos, son parcialmente inhibidos a concentraciones de 0.1 ng/ml y totalmente inhibidos a concentraciones de 0.2 ó 0.3 ng/ml. Los *Streptococcus thermophilus* y los *Lactobacillus*, son 10 veces más susceptibles a la penicilina, que los *Streptococcus* mesófilos (COPROICA. 2003).

Ya que en muchos casos la leche con residuos de antibióticos es mezclada con el resto de la leche libre de los mismos, un ejemplo del grado de afectación que puede representar el tratamiento con penicilina para el procesamiento industrial refiere que un tratamiento vía intramamaria de una vaca con 200 mg de penicilina G es capaz de contaminar la leche de 8.000 vacas (Prado *et al.* 2002).

2.7. Termoestabilidad de los antibióticos en leche y período de retiro del ordeño.

En muchas ocasiones la leche producida por vacas tratadas con antibióticos no es eliminada, y se destina a la comercialización en mercados, se mezcla con leche de buena calidad para evitar que los residuos sean detectados o se destina para procesos de industrialización, sin embargo se debe tener en cuenta que los tratamientos térmicos no son capaces de eliminar sustancias inhibitoras como los antibióticos contenidos en la leche y se tiene conocimiento que la pasteurización elimina solamente el 8% de actividad de la penicilina, y no se tienen datos que inactive o elimine sustancias como la tetraciclina (ver anexo cuadro A – 1), por lo cual, no es una opción someter la leche contaminada a dichos procesos, ya que un litro de leche contaminada con antibióticos es capaz de contaminar otros dos mil litros de leche, aun si son sometidos a procesos de pasteurización (Amiot, J. 1991).

Se ha constatado que el calor o frío que se utilizan en los procesos de industrialización de leche y pasteurización no destruyen totalmente la molécula de antibióticos, la ebullición de la leche destruye 90% de residuos de tetraciclinas (COPROICA. 2003).

Sin embargo, un tratamiento térmico más exigente aplicando 90°C por 30 minutos, puede destruir el 20% de la actividad de la penicilina y la esterilización hasta un 50% (Magariños, H. 2000).

Por lo antes mencionado es importante tener en cuenta el período de retiro de cada producto utilizado, y se debe tener un parámetro de por lo menos 48 a 72 horas de retiro de la ordeña para evitar la contaminación del resto de leche sana (Zurich, L y San Martín, B. 2004).

2.8. Normativas para los residuos de antibióticos en leche.

En cuanto a la norma salvadoreña de productos lácteos, leche pasteurizada y ultrapasteurizada con sabor. Especificaciones NSO 67.01.15:08 y la norma salvadoreña de productos lácteos para leche cruda de vaca. Especificaciones NSO 67.01.01:06, establecen que los límites máximos para residuos de plaguicidas, metales pesados y medicamentos veterinarios, las tolerancias admitidas en la leche pasteurizada y ultrapasteurizada y aséptica con sabor son las permitidas por el Codex Alimentarius para productos lácteos y derivados (CONACYT. 2010).

Para controlar la presencia de residuos de medicamentos en los alimentos, se han establecido los límites máximos de residuos, definiéndose como el contenido máximo de concentración de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario, expresado en µg/kg o g/kg sobre la base del peso en fresco, autorizada en la comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio. (Residuos de sustancias antimicrobianas en la leche. sf).

De acuerdo con los lineamientos del Codex Alimentarius, es indispensable que todas las personas que intervienen en la autorización, elaboración, venta y suministro, prescripción y aplicación de antibióticos en el ganado productor de leche actúen dentro del marco legal y responsablemente, a fin de limitar la diseminación de microorganismos resistentes entre los animales y la presencia de residuos de éstos medicamentos en la leche, para proteger la salud pública, y cumplir con la obligación ética y la necesidad económica de conservar la salud de los animales (Reyes, BR. 2006).

Desde el descubrimiento de los antibióticos como principal elemento de lucha antibacteriana, organismos de países de gran desarrollo lechero han dictado normas que han sido acogidas por otras naciones. Así, en 1962, la FDA, de Estados Unidos dictó normas de control de antimicrobianos y cuenta con una base de datos de los límites residuales en alimentos de origen animal estableciendo sanciones para quienes incumplan estas disposiciones. Por otra parte, en Inglaterra, algún tiempo después, el Milk Marketing Board introduce, con carácter obligatorio, un test de residuos en leche y dicta normas sobre manejo de antibióticos en la vaca lechera. A fines de la década del 60, la Organización Mundial de la Salud y otros organismos internacionales como la FAO, establecen normas con fines de información y orientación de los países miembros, respecto de las concentraciones de residuos permitidas en leche de antibióticos de uso frecuente en bovinos de leche, listado que ha ido incrementando en número de acuerdo a la incorporación de nuevos agentes antibacterianos. En la actualidad se cuenta con un listado que permite conocer las concentraciones máximas permitidas y su detección por diversos métodos (Mora, N y García, A. 2007).

Los límites máximos de residuos de Bencilpenicilinas en leche de vaca son de 4 $\mu\text{g/L}$, permitiendo una ingesta diaria de 30 μg de penicilina por persona por día (ver anexo cuadro A – 2), por lo cual los residuos de dicha sustancia deberían mantenerse por debajo de esta concentración. Por otro lado, los límites máximos de residuos de Clortetraciclina, Oxitetraciclina y Tetraciclina es de 100 $\mu\text{g/L}$, permitiendo una ingesta diaria de 0 – 30 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal (ver anexo cuadro A – 3), el establecimiento del IDA, de un residuo medicamentoso o químico constituye una guía para conocer la cantidad máxima que puede ingerirse diariamente con el alimento sin riesgo apreciable para el consumidor (CODEX ALIMENTARIUS. 2011).

El IDA es la base para obtener el límite máximo de residuo, que son las concentraciones máximas permitidas en una matriz determinada para leche, carne, miel, entre otros, de una sustancia química. El LMR varía de un país o bloque comercial a otro y éstos tienen que ser tenidos en cuenta en el momento de exportar algún producto de origen animal (Boggio, JC. 2010).

La Bencilpenicilina y la Oxitetraciclina se encuentran entre los antimicrobianos cuyos residuos han sido evaluados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud, a través del Comité

Mixto FAO-OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, además, la tetraciclina, es un antibiótico que no ha sido aprobado para utilizarlo en ganado de producción de leche (FAO. 2012).

2.9. Período de retiro

El conocimiento de las concentraciones residuales y farmacocinética de los antibióticos, permiten establecer período de resguardo, también llamado tiempo de supresión o período de suspensión, el cual indica el tiempo en horas o días, entre el final de una terapia sistémica o local y el momento en que las concentraciones de antibióticos en leche se encuentra en niveles de máxima tolerancia de acuerdo a normas dictadas por la Organización Mundial de la Salud o el FDA, indicando cuando la leche se encuentra apta para el consumo humano. (ver anexo Cuadro A – 4).

El período de retiro es variable debido a diferentes factores como la estructura fisicoquímica del antibiótico, excipientes, condiciones de administración, farmacodinamia y cinética en la vaca lechera, por esto hay que tener en cuenta las distintas presentaciones farmacéuticas, de larga acción, acción rápida o intermedia. Los períodos de retiro varían de acuerdo al país, sin embargo se aceptan los valores establecidos por la OMS (Zurich, L y San Martín, B. 2004).

2.10. Manejo y uso racional de antibióticos en ganado lechero.

El uso racional de los antibióticos implica la restricción de los mismos en casos justificados, elegir un fármaco con la duración y dosis adecuadas; además en muchos casos podría utilizarse algún antibiótico de corto espectro y medicar únicamente a los animales enfermos y no a todo el grupo de animales, así, al hacer uso menos intensivo de antibióticos, favorece a que las cepas susceptibles compitan con las resistentes, asegurando un rápido retorno de la flora normal después del tratamiento. (COPROICA. 2003).

Debido a que una de las principales causas del uso de tratamientos antibióticos está directamente relacionada con el nivel de mastitis de cada explotación, el establecimiento

de un programa de control y prevención ante éste padecimiento es fundamental para minimizar la posibilidad de contaminar el resto de leche con antibióticos, en especial la que se encuentra en los tanques recolectores y está lista para procesos de industrialización, dicho programa debe basarse en puntos importantes como, visita periódica de un Médico Veterinario, revisión semestral de las maquinas de ordeño, adecuada higiene del establo, adecuada técnica de ordeño, tratamiento antibiótico en la lactación, manejo del período seco y la eliminación de animales con problemas crónicos. Además para evitar la presencia de antibióticos en la leche, se debe tener en cuenta la asesoría del Médico Veterinario para el uso responsable e indicado de los diferentes tratamientos antibióticos, la utilización de medicamentos registrados, legalizados y perfectamente etiquetados, respetar la especie de destino y las dosis de cada fármaco, teniendo en cuenta los períodos de supresión para no incorporar al tanque la leche de animales tratados tanto en la fase de administración del medicamento como durante el período de supresión, por lo cual no debe utilizarse fármacos que no especifiquen dicho período, también, deben identificarse las vacas tratadas, llevar un registro estricto de los tratamientos, usar una unidad de ordeño exclusiva para animales tratados y dar un correcto manejo a las vacas secas, las cuales al encontrarse en tratamiento antibiótico de secado tienen una permanencia en la ubre de 5 a 7 semanas pudiendo acortarse o alargarse, para lo cual se deberá tener en cuenta los cuidados antes mencionados con respecto a la leche de dichas vacas (Instituto Lactológico de Lekunberri. 2004).

2.11. Factores de variación de la presencia de residuos de antibiótico en leche.

La eliminación de los medicamentos de forma activa en el organismo depende de los procesos de biotransformación y excreción, el volumen de distribución y la unión del fármaco a proteínas plasmáticas, debido a esto, las vías de excreción de los medicamentos en orden de importancia son vía renal, biliar, pulmonar, mamaria, salival, secreciones gastrointestinales, cutánea y vía genital. La excreción de los agentes antimicrobianos a través de la leche depende de una serie de factores físico-químicos, como pH, solubilidad del fármaco en lípidos y unión de éste a las proteínas. A su vez, éstos factores pueden verse alterados por la enfermedad y provocar cambios sistémicos o locales en la distribución de dicha sustancia (Sumano, HS y Ocampo, L. 1997).

Sin embargo, existen factores inherentes a la aplicación de fármacos que pueden influir tanto en la cantidad como en la duración de los tiempos de excreción, además de la presencia de sus residuos en la leche, algunos de estos factores son: La naturaleza del antibiótico, porque el carácter ácido o básico del antibiótico puede ser importante para su presencia en la leche, ya que los antibióticos básicos son los menos ionizados al pH de la leche y se difunden mejor que los de tipo ácido. La dosis administrada, ya que un aumento de ésta implica un alargamiento en la duración de la eliminación de los antibióticos inyectados por vía parenteral; en cuanto a los productos intramamarios, el incremento de la dosis también puede aumentar la duración de la eliminación. La influencia del excipiente, los fármacos inyectados por vía parenteral que poseen excipientes oleosos tienen un período de eliminación más largo que el de los excipientes acuosos. La vía de administración, ya que el cambio de la vía de administración puede modificar la concentración del antibiótico en la leche y la duración de su período de eliminación de la dosis; y finalmente el estado sanitario de la ubre, debido a que el tratamiento contra la mastitis modifica el pH y la composición de la leche, de igual forma, los procesos de filtración entre la sangre y la leche se encuentran alterados, por lo cual el paso de antibióticos a la leche puede ser diferente si se comparan animales sanos con enfermos (Roca, MI. 2008).

2.12. Métodos de detección de residuos de antibióticos en leche

Existen diferentes métodos que se emplean para detectar residuos en leche, sin embargo, la implementación de éstos depende del presupuesto con el que cuente ya sea la empresa privada o el estado; el método microbiológico detecta la presencia o ausencia de un determinado fármaco y puede incluso cuantificar la concentración del mismo, debido a esto es usado habitualmente por su costo. Los test rápidos o Snap Test, tales como el BRT, BR-Test, Copan, Delvotest o Eclipse son algunos de los métodos más utilizados hoy en día y todos ellos emplean el *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, antes denominado *Bacillus stearothermophilus*, como microorganismo de prueba, son utilizados comúnmente para conocer la presencia o ausencia de determinado fármaco y basándose en el cambio de color para compararlo posteriormente con una escala. Por otro lado, entre los métodos de confirmación cualitativos, existen actualmente distintos tipos de métodos enzimáticos, inmunoenzimáticos, de unión a receptores, que permiten detectar de una

forma más específica y por lo general más rápida, la presencia de residuos de antibióticos y sulfonamidas en la leche (Residuos de sustancias antimicrobianas en la leche. sf).

En cuanto a los métodos utilizados en la fase de confirmación y cuantificación, se emplean métodos físico-químicos que se utilizan para identificar y cuantificar de una forma inequívoca la presencia de residuos de antimicrobianos en las muestras de leche, sin embargo, estos métodos son caros y muy laboriosos, y también requieren haber analizado mediante instrumentación muy precisa un amplio rango de controles positivos a diversas concentraciones conocidas para poder extrapolar mediante curvas patrón la concentración de la muestra problema. Las técnicas cromatográficas de gas y de líquidos son las que se emplean con mayor frecuencia. (Roca, MI. 2008).

Los métodos cuantitativos se basan en la capacidad de difusión del antibiótico en el medio de cultivo que contiene una determinada cepa bacteriana control, sobre el cual se colocan cilindros de acero con muestra de leche y luego se incuban por un período de tiempo, se observan los halos de inhibición proporcionales a la concentración del fármaco en cada cilindro (Zurich, L y San Martín, B. 2004).

2.12.1. Métodos microbiológicos para detección de residuos antibióticos en leche

Los métodos cualitativos, se clasifican en métodos microbiológicos, capaces de detectar la presencia o ausencia de un residuo en una muestra, y en métodos de confirmación cualitativa, específicos para la detección de un determinado grupo de antibióticos. Los métodos microbiológicos están basados fundamentalmente en pruebas de inhibición del crecimiento de un microorganismo específico, empleando para la detección de esta inhibición, diversos sistemas como indicadores de pH, redox, bioluminiscencia, etc. Estos métodos aprovechan fundamentalmente la capacidad de las bacterias de producir ácido, reducir colorantes o producir halos de inhibición en un medio de cultivo, de manera que el resultado se puede interpretar visualmente. (Roca, MI. 2008).

Existen dos métodos microbiológicos oficiales según en el Manual de Análisis Microbiológicos, para detectar sustancias que inhiben los microbios en la leche, los cuales son el método de cilindro placa, usando *Micrococcus luteus* como el organismo de prueba, y el método del disco de papel. El método de cilindro placa, es el método oficial para la detección cuantitativa de residuos de antibióticos β -lactámicos. El método cilindro placa

para detectar penicilina en leche en polvo puede ser aplicado al ensayo de penicilina en leche líquida dado por Kramer et al. Leche entera normal es usada como diluyente control en lugar del polvo seco de leche más un diluyente control establecido por el método, la leche normal que sirve como diluyente control debe ser probado antes de ser usada en el procedimiento para asegurar que no exhibe actividad bacteriana contra el organismo de prueba. Por otro lado, no es necesaria ninguna preparación para las muestras de leche a examinar, son probadas tan pronto como son recibidas. En todos los casos, las muestras de leche deben estar frescas. El método del disco, es el método oficial cualitativo de detección de sustancias inhibidoras en la leche, es una modificación del método aprobado por la Federación Internacional de Leche, IDF, para la detección cualitativa de penicilina en la leche (Maturín, L. 2001).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Descripción del estudio

El estudio se realizó en 5 haciendas productoras de leche ubicadas en el Municipio de San Luis Talpa, Departamento de La Paz, las cuales fueron previamente seleccionadas según las exigencias de la investigación.

Las muestras de leche se tomaron del tanque almacenador de cada ganadería, procedente del primer ordeño, colectándose en un recipiente estéril de plástico, para luego almacenarse y transportarse en refrigeración hacia el laboratorio, todas las muestras de leche se tomaron y llevaron al laboratorio el mismo día, para su procesamiento. Dicho muestreo se realizó cinco veces de forma semanal.

El estudio fue complementado con el muestreo de dos marcas de leche pasteurizada, las cuales son procesadas en el país, ambas leches son ampliamente distribuidas en el medio; las muestras se compraron en diferentes salas de ventas con alta afluencia de compradores a intervalos de una semana, realizando cinco repeticiones.

3.2. Materiales, Equipos, Reactivos, Medios de cultivo, Cultivos bacterianos.

Equipos	Materiales
Autoclave	Agitadores electromagnéticos
Balanza analítica	Balón de fondo plano de 10 ml, 100 ml
Balanza semianalítica	Beaker 10 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml
Estufa	Botella de Roux
Hot Plate	Frascos de plástico con tapa rosca para muestra
Incubadora	
Refrigeradora	Cámaras de acero inoxidable para esterilización de placas petri contaminadas

Cilindros de acero inoxidable 8x6x10 mm	Agua destilada
Erlenmeyer 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml	Buffer Fosfato pH 6.0 ± 0.1
Frascos ámbar para reactivos	Cultivo bacteriano de <i>Micrococcus luteus</i>
Micropipetas automáticas (200 µl, 100 µl, 50 µl, 20 µl)	Cultivo bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i>
Peras de succión	Medio Agar Antibiótico No. 1 (HIMEDIA)
Perlas de vidrio	Medio Agar Antibiótico No. 11 (HIMEDIA)
Pipetas aforadas 1ml, 5ml, 10 ml	Medio Agar Antibiótico No. 4 (HIMEDIA)
Pipetas pasteur	Solución salina estéril 0.85 %
Pipetas volumétricas 1 ml, 5 ml, 10 ml	Otros
Pipeteadores	Alcohol etílico
Placas Petri	Alcohol isopropílico
Placas Petri 100 d X 15 h	Detergente
Puntas de micropipetas	Escalímetro
Termómetro	Gabacha Blanca
Tubos de vidrio con tapa rosca 10 ml, 25ml, 70 ml	Gorros descartables
	Guantes de Látex
*Toda la cristalería debe estar estéril para ser utilizada en el laboratorio, además de los frascos plásticos para la recolección de muestras.	Hielera
	Hipoclorito de sodio
	Hisopos
Reactivos, Medios de cultivo y cultivos bacterianos	Mascarillas descartables
Acido Clorhídrico 0.1 N	Mecheros
	Tirro

3.3. Metodología de Campo

Para realizar este estudio como primera fase se realizaron una serie de visitas exploratorias a diferentes ganaderías que se encuentran en el municipio de San Luis Talpa.

El Municipio de San Luis Talpa posee una extensión territorial de 65.96 km², de los cuales aproximadamente 0.02 km² corresponde al área urbana y 65.76 km² al área rural; siendo de fuerte vocación agropecuaria (ver anexos Figura A - 1)

La temperatura media es de 26.8 °C, el clima es cálido y pertenece al tipo de tierra caliente, al encontrarse a 45 metros sobre el nivel del mar. Los tipos de suelos que se encuentran son: Regosoles, Aluviones, Entiosoles, fase casi a nivel ligeramente inclinado, Pantanos sujetos a las mareas, Playas costeras y Suelos Aluviales. El monto pluvial anual oscila entre 1400 y 1800 mm.

En dichas ganaderías se expuso la necesidad que nos brindaran colaboración para el desarrollo de la investigación, con las muestras de leche e información general de la granja relacionada con el estudio, además, verificar cuales cumplían los requisitos mínimos de producción para formar parte de ésta investigación.

Luego de éstas visitas se seleccionaron aquellas explotaciones que cumplían con las características deseadas, tales como número de animales en producción, nivel de tecnificación, forma de comercialización de la leche y las que por motivos logísticos eran las más adecuadas. (ver anexos Figura A-2 – Figura A-6)

Seguidamente se visitaron las ganaderías seleccionadas y se obtuvo de cada una los datos principales tanto de manejo como de caracterización de cada una de las explotaciones muestreadas, para esto, se hizo uso de una encuesta (ver anexo A-1) la cual se diseñó para obtener de forma discreta los datos referentes al uso, frecuencia, tipo y vía de administración de los fármacos utilizados dentro del hato lechero. Luego se discutió con los encargados de las ganaderías la mecánica de la recolección de las muestras acordando fechas y horas en las que se realizarían las visitas.

La obtención de la muestra se hizo directamente del tanque colector, siendo ésta de 500 ml de leche cruda, la cual se almacenó en un recipiente plástico de tapa de rosca limpio y estéril, el cual fue rotulado e inmediatamente refrigerado entre 4 y 8 °C hasta el momento del procesamiento de la muestra, la recolección de éstas se realizó de Septiembre a

Noviembre de 2011. Dicha fase sufrió una modificación de dos semanas debido la presencia de un fenómeno meteorológico en nuestro país.

En lo referente a las muestras de leche pasteurizada, se seleccionaron diferentes sucursales de un supermercado con mayor afluencia de personas, de las cuales se obtuvieron muestras de 500 ml de leche sometida a procesos de pasteurización de la marca X y Y de forma semanal para realizar las respectivas pruebas. Estas muestras se trasladaron al laboratorio en refrigeración a temperatura de 4 a 8 °C para ser procesada adecuadamente, dicha recolección se realizó de Noviembre a Diciembre de 2011.

3.4. Metodología de Laboratorio

La fase de laboratorio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

Las pruebas utilizadas para la determinación de residuos de antibióticos en leche fueron realizadas a través del método microbiológico establecido por el Manual de Análisis Bacteriológicos, BAM, por sigla en inglés, respaldado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, (FDA) por su sigla en inglés, siendo el método oficial para la detección cuantitativa de residuos β -lactámicos el método de cilindro-placa con *Micrococcus luteus*. Debido a que no existe un método establecido para la determinación de residuos de tetraciclina en leche, se adaptó el mismo método antes mencionado para los residuos de tetraciclina, respaldado por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 30). Para el desarrollo del método se utilizan cilindros de acero inoxidable de 8 + 0.1 mm diámetro exterior, 6 + 0.1 mm diámetro interior y 10 + 0.1 mm de largo, y placas Petri con cubiertas de 100 mm diámetro x 15 mm altura; Agar Medio Antibiótico No. 1, No. 4 y No. 11, todos marca HIMEDIA, buffer fosfato pH 6.0 + 0.1, Acido Clorhídrico 0.1 N, Penicilina G y Tetraciclina HCl (sin excipientes), y solución salina estéril al 0.85%.

Previo al inicio de la fase de laboratorio, se prepararon los diluyentes control de buffer fosfato para β -lactámicos, y de Ácido Clorhídrico 0.1 N para Tetraciclina. (ver Anexo A - 2). Se lavó toda la cristalería y se empaquetó para esterilizar en la estufa (ver anexos Figura A-7), se prepararon los medios de cultivo de acuerdo a las instrucciones de cada etiqueta en la cantidad necesaria, los tubos con Agar inclinado para sembrar las bacterias a utilizar y solución salina en tubos de ensayo, para luego esterilizar en autoclave.

3.4.1. Preparación y reconstitución de medios

Los medios de cultivo utilizados se reconstituyeron con agua destilada, diluyendo la cantidad indicada por el fabricante, se pesaron los gramos del medio deshidratado necesarios para la cantidad a preparar y se colocaron posteriormente en un erlenmeyer, luego debía calentarse hasta la ebullición y que estuviera completamente disuelto, el medio cambiaba a un color transparente y a una consistencia densa, luego se cubría con papel aluminio y posteriormente se esterilizaba en el autoclave a 121 °C a 15 libras de presión por 15 minutos.

El medio antibiótico No. 1 fue usado para la detección microbiológica de residuos de antibióticos β -lactámicos y otros antibióticos, con el cual se puede determinar la actividad de un antibiótico mediante halos de inhibición en el crecimiento bacteriano del *Micrococcus luteus*, siendo este el microorganismo de prueba. Se utilizaron 30.5 gramos por cada 1000 ml de agua destilada.

El medio Antibiótico No. 4 fue utilizado para la suspensión bacteriana del inóculo de ambos antibióticos, debido a la composición que este medio proporcionaba a los microorganismos de prueba los requerimientos nutricionales para el crecimiento de los mismos, al reconstituirlo, se utilizaban 26.5 gramos por cada 1000 ml de agua destilada.

El medio antibiótico No. 11 fue usado para la detección microbiológica de residuos de tetraciclina, con este medio se determinaba la actividad del antibiótico a través de la formación de halos de inhibición en el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus*. Se utilizaron 30.5 gramos por cada 1000 ml de agua destilada.

3.4.2. Preparación del inóculo

Como primer paso se prepararon los microorganismos de prueba con al menos dos días de anticipación al día que se debían realizar las pruebas; para los antibióticos β -lactámicos se utilizó el *Micrococcus luteus* y para la tetraciclina el *Staphylococcus aureus*. Se transfirió el *Micrococcus luteus* a tubos de ensayo con agar inclinado de Medio Antibiótico No. 1 y el *Staphylococcus aureus* a tubos de ensayo con agar inclinado de Medio Antibiótico No. 11; ambos se incubaron de 18 a 24 horas a 32-35 °C (ver anexos Figura A-8).

Se lavó el crecimiento con 1 a 2 ml de solución salina y se transfirió a una botella de Roux con 300 ml de Medio Antibiótico No. 1 para β -lactámicos y Medio Antibiótico No.11 para

Tetraciclina. Se incubó de 18 a 24 horas a 32-35 °C. Se lavó el crecimiento de la superficie de cada uno de los agares con 50 ml de solución salina y posteriormente se recolectó en un tubo de ensayo, para ser guardado en refrigeración y usar el inóculo por un máximo de 2 semanas (ver anexos Figura A – 9). Se utilizó de 0.1 a 0.5 ml del inóculo por cada 100 ml del medio antibiótico No. 4, siendo para β -lactámicos como para Tetraciclina el medio adecuado para la suspensión y crecimiento bacteriano (ver anexo Figura A – 16).

3.4.3. Preparación de las Placas Petri

Al tener listos los microorganismos de prueba, se prepararon las placas para la determinación de cada antibiótico de la manera siguiente:

Para antibióticos β -lactámicos, se añadieron 10 ml de Medio Antibiótico No. 1 fundido y mantenido a 45 °C a cada caja de petri vacía y estéril. Para Tetraciclina, se añadieron 10 ml de Medio Antibiótico No. 11 fundido y mantenido a 45 °C a cada caja petri vacía y estéril. Se homogenizaron y se dejaron solidificar unos segundos. Dicho procedimiento se realizó cerca del mechero para evitar la contaminación de la placa preparada.

Se agregó de 0.1 a 0.5 ml del inóculo preparado con anterioridad, *Micrococcus luteus* para β -lactámicos y *Staphylococcus aureus* para Tetraciclinas, por cada 100 ml del Medio Antibiótico No. 4 fundido y mantenido a 45 °C. Se homogenizó y se añadieron 4 ml del agar inoculado a cada placa petri con pipetas graduadas y se distribuyó uniformemente. Se dejó endurecer. Estas placas se utilizaron el mismo día de su preparación (ver anexo Figura A– 17).

3.4.4. Preparación de las Curvas Estándar.

Previamente se prepararon las soluciones patrón para cada antibiótico con sus respectivas diluciones (ver anexo Figura A-10, Figura A-18).

Para la solución Stock de β -lactámicos se disolvió una cantidad previamente calculada y pesada de Penicilina G sin excipientes, correspondiente a 8.44 mg, a la cual se le agregó buffer fosfato pH 6.0 + 0.1 obteniendo una solución que contenía 1000 U/ml. A partir de ésta, se hicieron diluciones hasta obtener concentraciones de 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 U/ml (ver anexos Figura A-11). La concentración de referencia fue de 0.05 U/ml. Se llevó un control del diluyente que es una solución de buffer fosfato con leche en

polvo libre de antibiótico a razón de 1 g de leche por cada 3 ml de buffer. La solución Stock de penicilina tenía una vigencia de 2 días (ver Anexo A - 3).

Para la solución Stock de Tetraciclina, se disolvió una cantidad calculada y pesada de Tetraciclina HCl sin excipientes, correspondiente a 10.2 mg a la cual se le agregó Ácido Clorhídrico 0.1 N para obtener una solución de 1 mg/ml de concentración, a partir de la cual se prepararon diluciones hasta obtener concentraciones de 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 y 0.96 $\mu\text{g/ml}$. La concentración de referencia fue de 0.24 $\mu\text{g/ml}$. La vigencia de la solución Stock de tetraciclina era de un día. (ver Anexo A – 4)

Para cada punto de la curva se usaron 3 placas petri con Agar inoculado y se colocaron 6 cilindros de acero inoxidable separados adecuadamente, para cada tipo de antibiótico, se llenaron de forma alterna 3 cilindros con la concentración de referencia y los otros 3 cilindros con alguna otra concentración del estándar. Las 3 placas con las concentraciones más bajas produjeron resultados negativos, es decir que no produjeron halos de inhibición medibles, y las 12 placas restantes formaban la línea estándar de respuesta, dando 45 determinaciones de la concentración de referencia y 9 determinaciones para cada punto de la línea (ver anexos Figura A-12). Los resultados positivos produjeron halos de inhibición medibles. Se taparon las placas y se incubaron 16 a 18 horas a 30 °C.

Se invirtieron las placas para remover los cilindros y se midieron los diámetros de cada zona de inhibición lo más exacto posible con escalímetro, reportando los valores en mm.

Se corrigieron los valores obtenidos con las fórmulas dadas por la marcha del BAM y se hicieron los respectivos cálculos tanto para β -lactámicos como para tetraciclinas.

Se graficaron los valores en papel semilogarítmico de 2 ciclos para construir la línea recta que mejor atravesase los puntos, ya sea por inspección (ver anexos Figura A-26) o a través de las ecuaciones sugeridas por la marcha del Manual de Análisis Bacteriológicos (ver anexo Figura A-19).

3.4.5. Preparación de la Muestra

En cuanto a la preparación de la muestra se usaron las placas previamente preparadas y se colocaron 6 cilindros por placa de forma que tuvieran la misma distancia entre cada cilindro, 3 de estos cilindros contenían la concentración estándar de referencia correspondiente a cada antibiótico y los otros 3 cilindros la muestra de leche sin ningún

tratamiento (ver anexos Figura A-13), cada uno de éstos cilindros se colocaron de forma intercalada. Por cada muestra se realizaron 3 placas con el procedimiento antes mencionado (ver anexos Figura A-14). Se taparon las placas y se incubaron de 16 a 18 horas a 30 °C. Se invirtieron las placas para remover los cilindros y se midieron los halos de inhibición con el escalímetro para reportar los valores en mm (ver anexo Figura A-20).

3.4.6. Cálculo de potencia

Se promediaron las zonas de lectura del estándar y las zonas de lectura de las muestras en 3 placas (ver anexos Figura A-15). Se ajustaron los valores sumando o restando la diferencia entre cada uno de ellos y se buscó la concentración de dicho valor ajustado en la curva estándar (ver anexos Figura A-22 – Figura A-25). Se leyó la concentración en la curva estándar correspondiente al tamaño de muestra ajustado (ver anexo Figura A-21).

3.4.7. Controles

Se hizo uso de controles para indicar que el grado de precisión y exactitud de los resultados obtenidos derivaban de la muestra y no de condiciones ambientales.

Las concentraciones estándares más bajas de la curva, debían producir resultados negativos, indicando que la droga puede estar presente pero en un nivel debajo del límite de detectabilidad.

La concentración estándar antes de la más baja en la curva, debería siempre producir resultados positivos.

La sensibilidad de la prueba es normalmente de 0.01 U/ml para antibióticos β -lactámicos.

Por cada muestra se realizaron 3 repeticiones para β -lactámicos y 3 repeticiones para tetraciclinas, además de realizar la curva estándar en la cual se utilizaron 15 placas para cada antibiótico cada vez que se trabajó un lote de muestras.

El diluyente control siempre debe producir resultados negativos (Maturín LJ. 2001).

3.5. Metodología Estadística

Para el análisis descriptivo de las concentraciones de residuos de antibióticos encontrados en las muestras analizadas de leches crudas y procesadas (unidades experimentales), se aplicaron diagramas de barras. Mientras que para el análisis inferencial se aplicó la prueba de "T" student para una muestra, ver fórmula 1.

Formula 1. T CALCULADA

$$/T \text{ cal/} = \frac{\text{Valor de la norma} - \text{valor de campo}}{\text{Desviación estándar}}$$

Una vez calculado su valor para las concentraciones de los residuos de tetraciclinas y β -lactámicos (variables en estudio) se procedió a la comparación contra los valores especificados por las normas del Codex Alimentarius, siendo para Tetraciclinas: 0 - 100 $\mu\text{g/L}$ y para Bencilpenicilinas 0-4 $\mu\text{g/L}$; y así aceptar o rechazar la hipótesis planteada, la cual reza de la siguiente manera: las muestras de leche analizadas contienen cantidades de antibióticos diferentes a las establecidas por la norma; es decir, que los residuos de antibióticos presentes están por encima de los niveles permitidos.

El procedimiento Prueba T para una muestra contrasta si la media de una sola variable difiere de una constante especificada. Es decir, se emplea en situaciones en las que se pretende contrastar la diferencia entre la media de una muestra y la de su población de origen. Así se puede saber si una determinada muestra procede de una población cuya media verdadera se conoce. En éste estudio se contrastó la diferencia entre la media de una muestra y el valor teórico establecido por la norma (Nuila, J. y Mejía, MA.1990).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Entre los efectos que pueden llegar a producir los residuos de antibióticos tenemos la sensibilización producida por una ingestión repetida de pequeñas dosis, aparición de procesos alérgicos en las personas, que en casos extremos llevaran a anafilaxia.

La presencia de estos residuos, provoca perturbaciones pasajeras en la flora intestinal del consumidor. Así mismo, reacciones de intoxicación frente a determinados antibióticos de gran toxicidad.

Finalmente la exposición repetida de las bacterias a los agentes antibacterianos, puede desarrollar en éstas, genes de resistencia a dichas sustancias y en consecuencia, resultar ineficaces para el tratamiento de enfermedades.

Es importante señalar que algunas de las sustancias farmacológicas presentes en la leche resisten las altas temperaturas, por lo que pueden llegar al consumidor aún después de haber sido sometidas a tratamientos térmicos en la industria, lo que agrava el problema para la salud pública (Jacquet y Auxepales, 1978; Sullivan *et al.*, 1981; Oda y Hiwaki, 1996).

4.1. Resultados de las encuestas realizadas en las Ganaderías

La realización de la encuesta fue hecha con el fin de conseguir información importante respecto al manejo en general de cada ganadería, además de obtener información detallada respecto al número de animales en producción, enfermedades comunes en el hato ganadero, tratamientos antibióticos suministrados a los animales enfermos, las actividades realizadas por un Médico Veterinario en caso de contar con uno y el tratamiento que se le daba a la leche luego de su extracción, además de otros puntos que no serán mencionados a continuación por su irrelevancia respecto al tema de investigación. La información adquirida ha sido utilizada para relacionar los resultados prácticos obtenidos y para generar conclusiones y posibles recomendaciones.

TABLA 1. RESULTADOS DE LA ENCUESTA REALIZADA A LAS GANADERÍAS

PREGUNTA	Ganadería 1	Ganadería 2	Ganadería 3	Ganadería 4	Ganadería 5
¿Cuales son las enfermedades que se presentan más comúnmente?	Mastitis Anaplasmosis Babesiosis Enfermedades respiratorias	Mastitis Anaplasmosis Babesiosis Enfermedades respiratorias Retención de placenta	Mastitis Enfermedades respiratorias Retención de placenta	Mastitis	Mastitis Enfermedades respiratorias Retención de placenta
¿Cuales son los fármacos que se utilizan para tratar las enfermedades? (antibióticos)	Jeringuilla Antimastitis S Emicina Unicil S	Jeringuilla Antimastitis S Emicina Unicil S	Jeringuilla Clavamox Amoxi LH Estrepto Bio Benzipen	Jeringuilla Clavamox	Jeringuilla Clavamox Lhifloxacina 5% Gentasol 80 Advosin Emicina
¿El ordeño es manual o mecánico?	Manual	Manual	Manual	Manual	Mecánico
¿Cuantos ordeños se realizan al día?	2	2	2	2	3
¿Cuantas vacas están en producción?	20 - 40	40 - 60	40 - 60	20 - 40	40 - 60
¿Cuál es el encaste que se maneja en la propiedad?	Brown Swiss – Brahman Holstein - Brahman	Brown Swiss - Holstein	Brown Swiss, Holstein	Brown Swiss - Brahman	Holstein Jersey
¿Asistencia Medico Veterinaria? (actividades)	Si. Cada 3 meses. Palpación	Si. Cada 6 meses. Palpación y revisión del hato	Si. Cada 6 meses. Palpación.	Si. Cada 6 meses. Palpación y revisión del hato	Si. Palpación y revisión del hato
Tratamiento de la leche post ordeño	Se recolecta, se almacena por 3 horas y se vende.	Se vende una hora después.	Mañana: se entrega una hora después. Tarde: se refrigera hasta la mañana siguiente	Queda en un recipiente una hora y se vende	Colección en el tanque y refrigerada a 3°C

4.2. Resultados de la determinación de Tetraciclina en leche

TABLA 1. VALORES ORIGINALES DE LAS CANTIDADES DE TETRACILINAS EN LECHE EN $\mu\text{g/L}$, OBTENIDOS EN LA INVESTIGACION.

Semana	Ganaderías					Leche Procesada	
	GA	GB	GC	GD	GE	LPX	LPY
1	1119	294	1143	+34 ve.	384	8592 ve.	6168 ve.
2	684	276	1119	+72 ve.	444	8256 ve.	8640 ve.
3	864	672	558	408	339	449	5280 ve.
4	396	288	366	396	144	5328 ve.	5088 ve.
5	936	624	606	645	+54 ve.	7200 ve.	8184 ve.

ve.= valores extremos

(+) = valores que se encontraron por debajo de los límites establecidos por la norma: 100 $\mu\text{g/L}$

Todas las concentraciones de residuos de tetraciclinas encontradas en las primeras tres ganaderías, GA, GB, GC, superaron el valor establecido por la norma, mientras que en las últimas dos, GD y GE, se obtuvieron tres valores que están por debajo de la misma y de manera general se presentaron las concentraciones de residuos más bajas entre las ganaderías muestreadas.

Las leches procesadas, LPX y LPY, mostraron resultados muy similares, los cuales a su vez fueron los más altos del estudio; esto se puede deber a que las empresas procesadoras reciben leche de una amplia variedad de ganaderías, las cuales son mezcladas para obtener un producto homogéneo; muchas de éstas ganaderías posiblemente no estén llevando adecuadas prácticas en el uso de antibióticos y en el tratamiento de la leche, por lo cual, estén suministrado leche con residuos de antibióticos. En ambas marcas de leche procesada los resultados fueron muy similares y constantes, a excepción de una muestra LPX, la cual registro una concentración similar a las encontradas en las ganaderías.

A partir de los valores extremos que se observan en la población, se hace necesario poner a todos los datos en igualdad de condiciones, para lo cual se debe aplicar una

transformación, y la que más se ajusta es la transformación logarítmica, la cual consiste en obtener logaritmo base diez (Log_{10}) de todos los datos.

Luego de aplicada la transformación, (ver anexos Cuadro A – 5), los datos son muy homogéneos y no presentan diferencias significativas entre los mismos, por lo cual se hace posible seguir su procesamiento.

Luego en el caso de las tetraciclinas, se multiplicaron por un factor que manifestaba el número de unidades enteras en que está definida la norma 100 $\mu\text{g/L}$, el cual posee tres dígitos, para éste caso fue aceptable usar éste mismo valor.

Una vez realizada esta transformación y la multiplicación por el factor, (ver anexos Cuadro A – 6), se procedió a aplicar la prueba de “T” student para una muestra, ver formula 1.

TABLA 4. COMPARACION ENTRE LOS VALORES DE T CALCULADO Y T TABLA

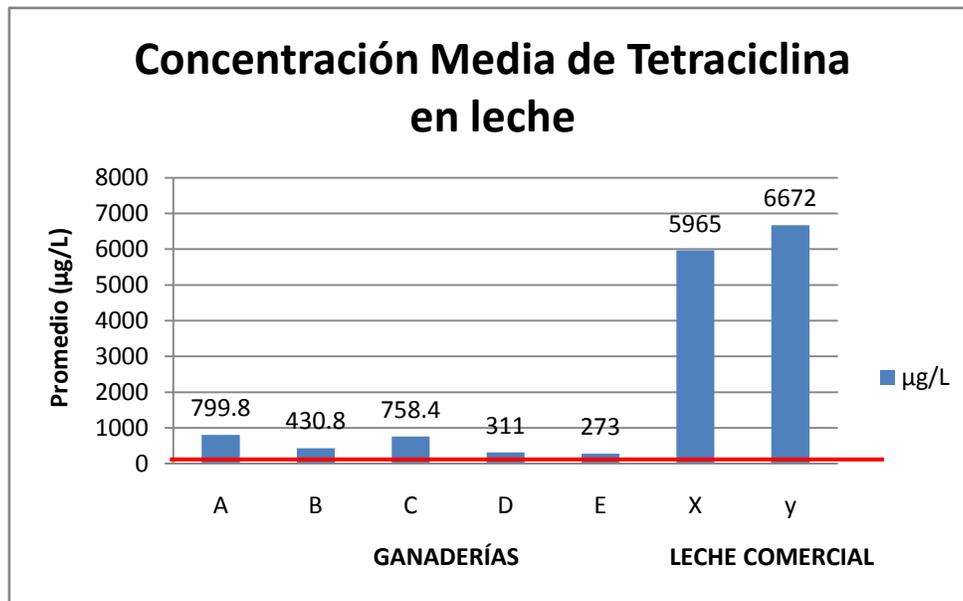
MUESTRA	ANTIBIOTICO ANALIZADO	X	XON-1	T calculado	T tabla	VALOR PERMITIDO POR LA NORMA Tetraciclinas: 0-100 ($\mu\text{g/L}$)
GA	Tetraciclina	287.79	17.44	10.77*	1.94	Arriba del valor permitido
GB	Tetraciclina	259.82	19.51	8.19*	1.94	Arriba del valor permitido
GC	Tetraciclina	284.17	21.42	8.6*	1.94	Arriba del valor permitido
GD	Tetraciclina	228.14	55.45	2.31*	1.94	Arriba del valor permitido
GE	Tetraciclina	233.05	38.47	3.45*	1.94	Arriba del valor permitido
LPX	Tetraciclina	361.74	54.57	4.8*	1.94	Arriba del valor permitido
LPY	Tetraciclina	381.37	10.64	26.44*	1.94	Arriba del valor permitido

*: Significativo; es decir que se acepta la hipótesis alterna

El valor de T tabla se obtendrá utilizando los grados de libertad = 6 (5 ganaderías + 2 leches procesadas -1), y el nivel de confianza es del 5% (t .05) (ver anexo Figura A-27).

Análisis: las muestras de leche obtenidas en las diferentes ganaderías, y marcas comerciales, superaron significativamente los valores permitidos por la norma. Presentando el mayor valor la muestras LPY, seguido de las muestras GA, GC y GD.

GRAFICO 1. EL SALVADOR 2011. CONCENTRACION MEDIA DE TETRACICLINA EN LAS MUESTRAS DE LECHE ANALIZADAS



Como se aprecia en el gráfico los niveles de residuos de tetraciclinas encontrados en las leches procesadas presentan los valores más altos; no así en las leches de las ganaderías en donde se obtuvieron las menores concentraciones, siendo las más bajas las de la ganadería E. Los valores obtenidos tanto en leches crudas, como pasteurizadas superan el valor establecido por la norma de Codex Alimentarius 100 µg/L.

Estadísticamente los resultados obtenidos en el laboratorio no se ajustaron a lo señalado por la norma del Codex Alimentarius; es de esperar que posiblemente las personas que consuman constantemente éstos productos, especialmente los niños en crecimiento, puedan padecer ciertos desordenes como lo señalan Jawetz, et al. (1992) y Sanchez (1995), tales como el desarrollo de problemas de osificación, dentición y pueden inducir resistencia bacteriana. Asimismo, puedan desarrollar trastornos gastrointestinales como nauseas, vómitos, diarreas, además de erupciones cutáneas, lesiones en las mucosas y fiebre.

4.3. Resultados de la determinación de β -lactámicos en leche

TABLA 5. VALORES ORIGINALES DE LAS CANTIDADES DE BENCILPENICILINAS EN LECHE EN $\mu\text{g/L}$, OBTENIDOS EN LA INVESTIGACION.

Semana	Ganaderías					Leche Procesada	
	GA	GB	GC	GD	GE	LPX	LPY
1	63.6	1272 ve.	1356 ve.	51	4.2 ve.	666	1314 ve.
2	417	228	252	297	285	924 ve.	1740 ve.
3	177	204	150	272	237	612	1384 ve.
4	51	240	281.4	45	54	624	1398 ve.
5	36	90	40	59	63	546	1608 ve.

ve.= valores extremos

Todas las concentraciones de residuos de β -lactámicos en las ganaderías muestreadas superaron el valor establecido por la norma, siendo las GB y GC las que mayores concentraciones presentaron, mientras que en las restantes, GA, GD y GE, las concentraciones fueron notablemente más bajas, registrándose un valor que casi cumple con lo establecido por la norma $4 \mu\text{g/L}$, en la GE.

En el caso de las leches procesadas, LPY presentó valores muchos más altos que la LPX, la cual a su vez refleja valores más altos que el promedio de las ganarías. Estos valores tan elevados, tienen similar explicación a la propuesta en el caso de tetraciclinas.

A partir de los valores extremos que se observan en la población se hace necesario poner a todos los datos en igualdad de condiciones, para lo cual se debe aplicar una transformación, y la que más se ajusta es la transformación logarítmica, la cual consiste en obtener logaritmo base diez (Log_{10}) de todos los datos.

Luego de aplicada la transformación, (ver anexos Cuadro A – 7), los datos son muy homogéneos y no presentan diferencias significativas entre los mismos, por lo cual se hace posible seguir con el procesamiento de los mismos

En el caso de las Bencilpenicilinas el valor máximo permitido es de $4 \mu\text{g/L}$, un valor de un solo dígito, el cual es demasiado pequeño para usarlo como factor de conversión, se utilizó para este caso el factor de 10.

Una vez realizada esta transformación y la multiplicación por el factor, (ver anexos Cuadro A – 8), se procedió a aplicar la prueba de “T” student para una muestra, ver formula 1.

TABLA 8. COMPARACION ENTRE LOS VALORES DE T CALCULADO Y T TABLA

MUESTRA	ANTIBIOTICO ANALIZADO	X	XON-1	T calculado	T tabla	VALOR PERMITIDO POR LA NORMA Bencilpenicilina:0-4 (µg/L)
GA	Penicilina	19.87	4.38	3.62*	1.94	Arriba del valor permitido
GB	Penicilina	24.21	4.19	4.82*	1.94	Arriba del valor permitido
GC	Penicilina	23.52	5.51	3.54*	1.94	Arriba del valor permitido
GD	Penicilina	20.08	4.09	3.93*	1.94	Arriba del valor permitido
GE	Penicilina	17.97	7.33	1.91(NS)	1.94	Arriba del valor permitido
LPX	Penicilina	28.22	0.86	28.16*	1.94	Arriba del valor permitido
LPY	Penicilina	31.71	0.51	89.39*	1.94	Arriba del valor permitido

*: Significativo; es decir que se acepta la hipótesis alterna

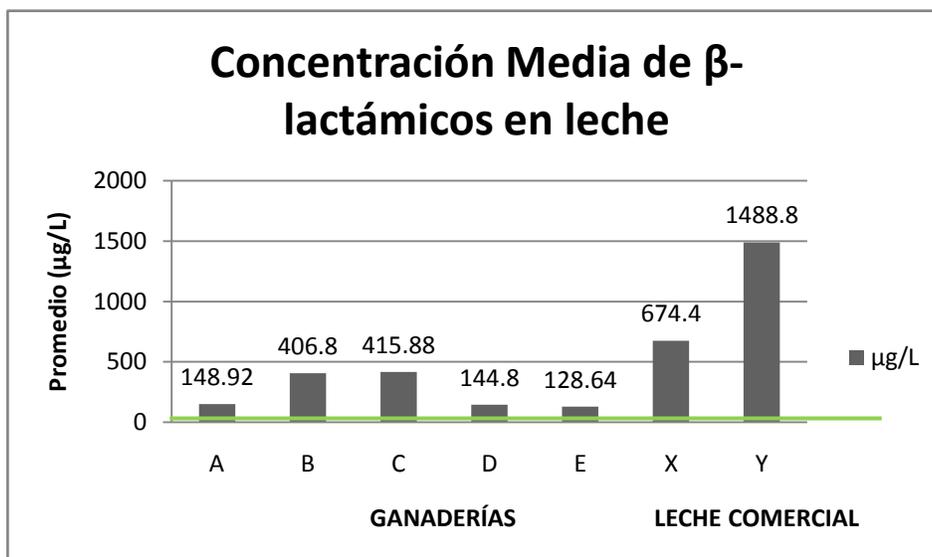
NS: No significativo; es decir que se acepta la hipótesis nula

El valor de T tabla se obtendrá utilizando los grados de libertad = 6 (5 ganaderías + 2 leches procesadas -1), y el nivel de confianza es del 5% (t .05) (ver anexo Figura A-27).

En la interpretación de la GE es la única en la cual no se acepta la hipótesis alterna, aunque los valores reales de antibiótico de éstas muestras claramente superan los valores que dicta la norma, la disparidad de los datos obtenidos a nivel de laboratorio hacen que la desviación estándar de los mismos sea muy alta, lo cual a nivel estadístico genera un error, el cual muestra que los valores sí se encontraban en los límites permitidos.

Análisis: las muestras de leche obtenidas en las diferentes ganaderías, y marcas comerciales, superaron significativamente los valores permitidos por la norma. Presentando el mayor valor la muestra LPY, luego la LPX seguidas de las muestras GB y GD.

GRAFICO 2. EL SALVADOR 2011. CONCENTRACION MEDIA DE β - LACTAMICOS EN LAS MUESTRAS DE LECHE ANALIZADAS



Como se aprecia en el gráfico los niveles de residuos de β -lactámicos encontrados en las marcas de leche procesadas presentan los mayores valores, siendo la leche procesada Y, la que muestra los valores más elevados, siendo más del doble con respecto a la leche procesada X. Mientras que en el caso de las ganaderías, fueron las A, D y E las que arrojaron las concentraciones más bajas. Las concentraciones obtenidas tanto en leches crudas como pasteurizadas superan el valor establecido por la norma de Codex Alimentarius de 4 $\mu\text{g/L}$.

Estadísticamente los resultados obtenidos en el laboratorio no se ajustaron a lo señalado por la norma del Codex Alimentarius, es de esperar que posiblemente las personas que consuman constantemente éstos productos, puedan padecer ciertos desórdenes como lo señalan Jawetz, *et al.* (1992) y Sánchez (1995), tales como el desarrollo de problemas de sensibilidad, así como hipersensibilidad retardada o inmediata, erupciones cutáneas, fiebre y shock anafiláctico.

5. CONCLUSIONES

1. En las muestras de leche cruda provenientes de las cinco ganaderías con las cuales se trabajó, se encontraron residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas que sobrepasan los límites establecidos.
2. Las ganaderías que reportaron mayor índice de enfermedades infecciosas, presentan en la mayoría de los casos, niveles más altos de residuos de ambos antibióticos en las muestras de leche.
3. Una de las causas potenciales de la existencia de altas cantidades de residuos de antibióticos en leche, es el uso indiscriminado de estos fármacos en el medio y el irrespeto a los tiempos de retiro de los mismos
4. Las marcas de leche procesadas analizadas presentan altas concentraciones de residuos de tetraciclinas, más de 63 veces el límite que establece la norma, éstas a su vez, superan por un amplio margen a las muestras de leche cruda que sobrepasan el límite establecido por cinco veces.
5. Las marcas de leche procesadas analizadas presentan altas concentraciones de residuos de β -lactámicos, siendo la marca Y, la que más residuos presenta, más de 372 veces el valor establecido por la norma, mientras que la marca X supera el valor permitido por 168 veces.
6. Los residuos de los antibióticos estudiados persisten en la leche tras los procesos de pasteurización que implementan las dos marcas comerciales analizadas.

6. RECOMENDACIONES

- 1) Que el profesional competente establezca los tratamientos de antibióticos correspondientes en casos de enfermedades infecciosas presentes en el hato lechero.
- 2) Fortalecer los programas de prevención y control de enfermedades en sus respectivas explotaciones, así como implementar programas de sanidad y bienestar animal en sus establos.
- 3) Hacer uso racional de los antibióticos en los tratamientos que se apliquen a vacas en producción, cumpliendo con el periodo de retiro, ya que el irrespeto de éste probablemente cause que exista residuos de antibióticos en leche.
- 4) A las autoridades gubernamentales competentes, que realicen auditorias periódicas a las ganaderías y plantas procesadoras para verificar la existencia de residuos de antibióticos en leche.
- 5) A los ganaderos, velar por que en sus propiedades se realicen buenas prácticas de ordeño, a fin de reducir el número de vacas con mastitis.
- 6) A los ganaderos, utilizar únicamente antibióticos que estén contemplados en el registro oficial de nuestro país.
- 7) Que las empresas procesadoras incluyan en su control de calidad de materia prima láctea el análisis de residuos de antibióticos.
- 8) Al ministerio de salud, que realice programas de vigilancia para velar que los residuos de antibióticos presentes en la leche procesada disponible al consumidor, estén por debajo de lo que establece la norma.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alderete, A. 2009. Prevención de residuos de antibióticos en leche. (En Línea). Misión Salesiana. AR. Consultado 27 ene 2011. Disponible en: <http://www.misionrg.com.ar/antiblec.htm>
2. Allara, M; Izquierdo, P; Torres, G; Rodríguez, B. 2002. Penicilina G en leche pasteurizada producida en el estado de Zulia-Venezuela. (En Línea). Revista científica FCV-LUZ, V XII N° 6. Maracaibo, VE, UDICTA. Consultado 2 abr 2011. Formato pdf. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27727/2/articulo1.pdf>
3. Amiot, J. 1991. Ciencia y tecnología de la leche: Principios y aplicaciones. Trad. RO Almudí. Ed. Fondation de Technologie Laitère du Quebec. Zaragoza, ES, Acribia. P. 90-100, 113,116.
4. Arias, ML; Antillón, F; Cubillo, Z. 2000?. Residuos de penicilina en leche bovina en Costa Rica. (En Línea). San José, CR. Consultado 12 mar 2011. Formato pdf. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v9n2/art3.pdf>
5. Balbero, JE y Balbero, VI. 2006. Determinación de residuos de antibióticos en leche de vaca en plantas procesadoras de productos lácteos en el Departamento de Sucre. (En Línea). Sincelejo, CO, se. Consultado 3 abr 2012. Formato pdf. Disponible en: <http://biblioteca.unisucre.edu.co:8080/dspace/handle/123456789/460>
6. Boggio, JC. 2010. Presencia de antimicrobianos en leche. (En Línea). AR, se. Consultado 18 feb 2012. Formato pdf. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/leche_subproductos/18-antimicrobianos.pdf
7. Bonilla, G. 1992. Estadística II. Métodos prácticos de ingeniería estadística. UCA editores. 2 ed. San Salvador, SV, Talleres gráficos UCA. P 11, 86, 92.
8. Brunton, L. 2007. Goodman ε Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Trads. JR Blengio; J Origanza; AM Pérez-Tamayo. Eds. JS Lazo; KL Parker. 11 ed. México, DF, McGraw-Hill Interamericana. P. 1127-1143, 1173-1180.

9. Camacho, LM. 2010. Residuos de antibióticos en leche cruda comercializada en la región de Tierra Caliente, de Guerrero, México. (En Línea). Revista electrónica de Veterinaria V 11, No. 2. Tierra Caliente, MX. Consultado 26 ene 2011. Formato pdf. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020210/021009.pdf>
10. CODEX ALIMENTARIOS. 2011. Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. (En Línea). Roma, IT, FAO-OMS. P. 4, 9. Consultado 8 nov 2011. Formato pdf. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_s_2011.pdf
11. CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, SV). 2010. Norma salvadoreña NSO 67.01.01:06: Productos Lácteos, Leche Cruda de Vaca, Especificaciones. (Primera Actualización). San Salvador, SV. 4p.
12. CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, SV). 2010. Norma salvadoreña NSO 67.01.15:08: Productos Lácteos, Leche Pasteurizada y Ultrapasteurizada con sabor, Especificaciones. San Salvador, SV. 7p.
13. COPROICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). 2003. Los residuos de medicamentos en la leche: Problemática y estrategias para su control. Eds. ME Parra; L Peláez; JE Londoño; N Pérez; G Rengifo. Neiva, CO, El Poirá. p. 19-60.
14. Engebretson, D. 2010. Diez razones comunes por las cuales ocurre la contaminación con antibióticos en los tanques de leche a granel. (En Línea). Illinois, US. Consultado 10 abr 2011. Formato pdf. Disponible en: <http://www.pdf4me.net/pdf-data/antibioticos.pdf>
15. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2012. Anteproyecto de Límites máximos para residuos de Medicamentos Veterinarios. (En Línea). SI, se. Consultado 28 abr 2012. Formato htm. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/w0062s/W0062S06.htm>

16. Guerrero, DM; Mofa, R; Gamarra, G; Benavides, ER; Roque, M; Salazar, ME. 2009. Detección de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en leche cruda comercializada en el Callao. (En Línea). PE, UNMSM. Consultado 12 mar 2011. Formato pdf. Disponible en: http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v12_n2/.../a05v12n2.pdf
17. Instituto Lactológico de Lekunberri. 2004. El empleo responsable de medicamentos en explotaciones ganaderas. Legislación, Riesgos y Métodos analíticos. (En Línea). ES, se. Consultado 12 feb 2012. Formato pdf. Disponible en: www.itgganadero.com/itg/portal/documentos.asp?id=228&d=1
18. Jacquet, J; Auxepaules, M. 1978. Le problème de la pollution du lait par les antibiotiques. État actuel de la question. Trad. A Bull. Francia, s.n.t. p. 51, 73-79.
19. Jawetz, L; Melnick, J; Adelberg, S. 1992. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg, 14 Ed. México, El Manual Moderno. p. 12-35.
20. Llanos, GA. 2002. Determinación de residuos de antibióticos en leche fresca que consume la población de Cajamarca. (En Línea). Revista Amazónica de Investigación Alimentaria, V2 N°2. Iquitos, PE. Consultado 22 ene 2011. Formato pdf. Disponible en: <http://www.unapiquitos.edu.pe/links/facultades/alimentarias/v22/4.pdf>
21. Magariños, H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda. Valdivia, CL, Producción y servicios Incorporados. P 53-62.
22. Maturin, L. 2001. Bacteriological Analytical Manual: Chapter 20A Inhibitory Substances in Milk. (En Línea). Washington DC, US, FDA. Consultado 20 ene 2011. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticaIManualBAM/UCM072661>
23. Mora, N y García, A. 2007. Susceptibilidad de bacterias acidolácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Pachuca MX. Tesis Lic. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 180p.

24. Noa, E; Noa, M; Gonzales, DG; Landeros, P; Reyes, W. 2010. Evaluación de la presencia de residuos de antibióticos y quimioterapéuticos en leche en Jalisco, México. (En Línea). Revista de salud animal V 31 N°1. Jalisco, MX. Consultado 15 feb 2011. Formato pdf. Disponible en: http://www.censa.edu.cu/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=760&Itemid=105
25. Nuila, J. y Mejía, MA.1990. Manual de Diseño de Experimentos: Con aplicación a la agricultura y ganadería. St. Sd. San Salvador, SV. P 62, 63, 64, 81.
26. Oda, T; Hiwaki, H. 1996. Heat stability of 24 antibiotics in food extracts. Japan, Food Hyg Soc. p. 37, 97-103.
27. Prado, G; Carabias, R; Rodríguez, E; Herrero, E. 2002. Presencia de residuos y contaminantes en leche humana. (En Línea). Revista Española de Salud Pública 76 (2): 133 – 147. ES. Consultado 2 feb 2012. Formato pdf. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/170/17076207.pdf>
28. Residuos de sustancias antimicrobianas en la leche. sf. (En Línea). Tesis Dr. Valencia, ES. Universidad Politécnica de Valencia. 180 p. Consultado 18 mar 2012. Formato pdf. Disponible en: <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/1977/tesisUPV2193.pdf>
29. Reyes, BR. 2006. Acciones para evitar los efectos indeseables de la aplicación de antibióticos al ganado productor de leche. 4p. (En Línea). MX, se. Consultado 16 mar 2012. Formato doc. Disponible en: www.cofocalec.org.mx/docs/Antibioticos%20en%20leche.doc
30. Reyna, GE. 2009. Detección de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en leche comercializada en el mercado del Callao. (En Línea). Ed. JC Merino. Ciencia y Tecnología 12 (1): 25-31. Callao, PE, Editorial Universitaria. Consultado 25 ene 2012. Formato pdf. Disponible en: http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/eu/Revista_Ciencia_y_Tecnologia/CienciaTecnologia12.pdf

31. Roca, MI. 2008. Termoestabilidad de sustancias antimicrobianas en la leche. (En Línea). Tesis Dr. Valencia, ES. Universidad Politécnica de Valencia. 225 p. Consultado 24 abr 2012. Formato pdf. Disponible en: riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/3022/tesisUPV2884.pdf
32. Sánchez, G. 1995. Residuos de fármacos antimicrobianos en alimentos de origen animal: Problemática General. Revista ACOVEZ 8(2):30-45.
33. Sumano, HS y Ocampo, L. 1997. Farmacología Veterinaria. 2 Ed. México, DF, McGraw-Hill Interamericana. p. 118-127, 148-154.
34. UAM (Universidad Autónoma de México). 2010. Residuos de antibióticos en leche, advierten investigadoras de la UAM. (En Línea). Revista Salud Animal 31 (1). Consultado 12 nov 2011. Formato html. Disponible en: <http://www.comunicacionuniversitaria.uam.mx/boletines/indice/jun-11-10a.html>
35. Zurich, L y San Martín, B. 2004. Residuos antimicrobianos en leche: Normas sanitarias y conceptos de residuos. 1994. (En Línea). Monografías de Medicina Veterinaria, V16 N°1 y 2. CL, SISIB. Consultado 19 abr 2011. Disponible en <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/>

ANEXOS

Anexo A – 1. Encuesta para las explotaciones pecuarias

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA



ENCUESTA REALIZADA A EXPLOTACIONES PECUARIAS SOBRE MANEJO DE GANDO BOVINO Y PRODUCCIÓN LACTEA

Nombre y ubicación de la de la explotación: _____

Nombre del encargado: _____

SALUD ANIMAL

1) ¿Cuál es el plan profiláctico que se emplea en la explotación?

2) ¿Cuales son las enfermedades que se presentan más comúnmente? (terneros, vacas en producción, etc.)

3) ¿Cuales son los tratamientos que se efectúan para controlar estas enfermedades?

4) ¿Tiene asistencia de un medico veterinario? ¿Cuáles son sus labores?

MANEJO DEL HATO

1) ¿Qué tipo de manejo se le da al ganado? (estabulado, semiestabulado, etc.)

2) ¿Que tipo de pasto o alimentación se ofrece al ganado?

3) ¿El ordeño es manual o mecánico?

¿Cuántos ordeños se realizan al día?

¿A que edad se desteta a los terneros?

CARACTERISTICAS DEL GANADO

1) ¿Cual es el número total de animales del hato?

2) ¿Cuántas vacas están en producción?

3) ¿Los servicios se realizan por monta natural o inseminación artificial?

4) ¿A que edad se sirven las novillas?

5) ¿Cuántos partos da una vaca en toda su vida útil?

6) ¿Cuál es el encaste que se maneja en la propiedad?

COMERCIALIZACION

1) ¿Cuales son las actividades que se realizan en la explotación?

2) ¿Quiénes son los compradores de la leche?

3) ¿Cuánta leche venden? Y ¿cada cuanto?

4) ¿Cual es el precio de la botella?

Le agradecemos por su tiempo y por la información brindada.

Anexo A – 2. Preparación de reactivos

Preparación del Acido Clorhídrico (HCl) 0.1 N

Para calcular la cantidad necesaria para la formulación de un litro de HCl 0.1 N se utilizará la siguiente fórmula:

$$\frac{N}{0.1 N} = \frac{g \text{ HCl}}{\text{Peq HCl} \times V \text{ (L)}}$$

Se debe encontrar el peso equivalente y los gramos de HCl puros a partir de N.

$$g\text{HCl} = N \times \text{Peq} \times V \text{ (L)}$$

$$g\text{HCl} = 0.1 \text{ eq/L} \times 36.45 \text{ Mol/eq} \times 1 \text{ L}$$

$$g\text{HCl} = 3.65 \text{ g HCl puro}$$

$$\begin{aligned} \text{Peq} &= \text{PM}/Z \\ \text{PM} &= \text{HCl} \\ \text{H} &= 1 \\ \text{Cl} &= 35.45 \text{ g/mol} \\ \text{Peq} &= \text{PM}/\text{eq} \\ \text{Peq} &= 36.45 \text{ g/mol}/1 \text{ g} \\ \text{Peq} &= 36.45 \text{ mol/eq} \end{aligned}$$

Se deben encontrar los ml de HCl comercial a partir de la pureza del mismo.

Pureza de HCl comercial = 37.25 %

$$100 \text{ g Sln comercial} \longrightarrow 37.25 \text{ g HCl puro}$$

$$X \longleftarrow 3.65 \text{ g HCl puro}$$

$$X = 9.80 \text{ g HCl comercial}$$

Se debe encontrar el Volumen de HCl a ocupar con la fórmula de densidad.

$$d = M / V \qquad V = M / d$$

$$V = 9.80 \text{ g} / 1.18 \text{ g/ml}$$

$$V = 8.30 \text{ ml de HCl puro}$$

Al obtener la cantidad necesaria de HCl puro, se midió en una probeta y luego se colocó en un balón aforado de 1000 ml, se agregó lentamente agua destilada hasta aproximadamente la mitad del balón y se agitó, para homogenizar, luego, se continuó

agregando agua destilada hasta completar el volumen y se homogenizó. Finalmente, se trasladó a un bote de vidrio ámbar.

Preparación Buffer fosfato pH 6.0 ± 0.1

Se disolvió 8.0 g de fosfato de potasio monobásico y 2.0 g de fosfato de potasio dibásico en agua destilada y diluyó a un litro con agua destilada. Para el desarrollo de la fase de laboratorio se preparó una cantidad de 250 ml de la siguiente forma:

8 g Fosfato monobásico de Potasio (KH_2PO_4) \longrightarrow 1000 ml de agua destilada

X \longleftarrow 250 ml de agua destilada

X = 2 g de KH_2PO_4

2 g Fosfato dibásico de Potasio (K_2HPO_4) \longrightarrow 1000 ml de agua destilada

X \longleftarrow 250 ml de agua destilada

X = 0.5 g de K_2HPO_4

Se pesó la cantidad necesaria de cada sal reactiva en una balanza semianalítica, se colocó en un balón aforado de 250 ml, se agregó agua destilada hasta llegar a la mitad del balón para disolver adecuadamente los cristales y se continuó agregando agua destilada hasta llegar al aforo, se homogenizó y se guardó en un frasco de vidrio ámbar.

Preparación Solución salina estéril 0.85 %

Se pesó 0.85 gr en balanza analítica y se colocó en un balón aforado de 100 ml de agua destilada, luego se homogenizó y se vertió en tubos de ensayo con tapa de diferentes tamaños, para ser esterilizados posteriormente en la autoclave.

Anexo A – 3. Esquema de dilución para β -lactámicos

Soluto: Penicilina G Benzatínica sin excipientes

Pureza (Pp): 1185 U/mg

Solvente primario: Buffer Fosfato pH 6.0 \pm 0.1

Solvente secundario: Agua Destilada

Solución Stock: 1000 U/ml

Diluciones a preparar: 0.2 U/ml, 0.1 U/ml, 0.05 U/ml, 0.025 U/ml, 0.0125 U/ml y 0.00625 U/ml.

1185 U \longrightarrow 1 mg (Pp)

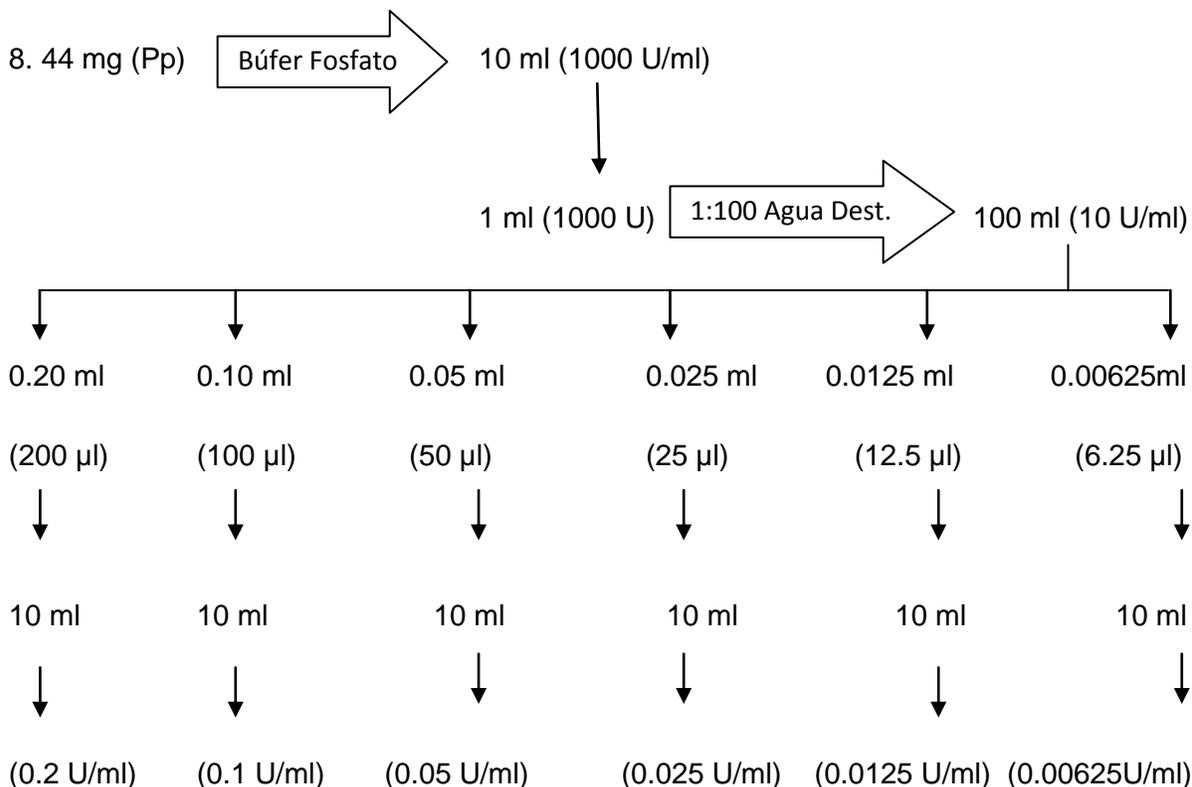
1000 U \longleftarrow X

X = 0.8439 mg (Pp) \equiv 1000 U/ml

0.844 mg (Pp) \longrightarrow 1 ml

X \longleftarrow 10 ml

X = 8.44 mg (Pp)



Anexo A – 4 Esquema de dilución para Tetraciclina

Soluto: Tetraciclina HCl sin excipientes

Pureza (Tp): 980 µg/mg

Solvente primario: Acido Clorhídrico 0.1 N

Solvente secundario: Agua Destilada

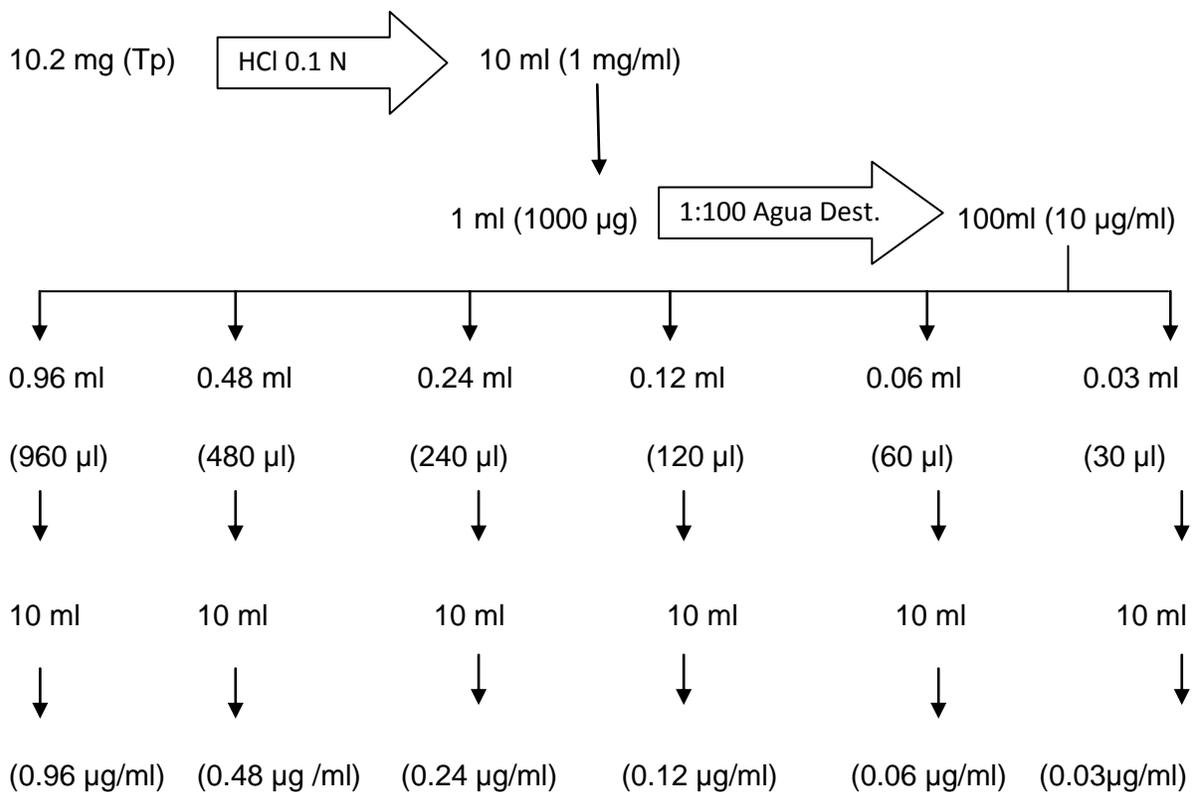
Solución Stock: 1 mg/ml

Diluciones a preparar: 0.96 µg/ml, 0.48 µg/ml, 0.24 µg/ml, 0.12 µg/ml, 0.06 µg/ml y 0.03 µg/ml.

980 µg → 1 mg (Tp)

10000 µg ← X

X = 10.2 mg (Tp) ≅ 10 mg (Tp)



LISTA DE CUADROS

Cuadro A – 1 Termoestabilidad y tiempo de eliminación de antibióticos

TERMOESTABILIDAD DE ALGUNOS ANTIBIÓTICOS			
ANTIBIOTICO	% DE ESTRUCCION SEGÚN EL TRATAMIENTO TERMICO		
	PASTEURIZACIÓN	90° C/ 30 min	100 °C/ 30 min
Penicilina	8 %	20 %	50 %
Clortetraciclina	-	-	90 %
Oxitetraciclina	-	-	90 %

Fuente: Magariños H. 2000.

Cuadro A – 2 Límites máximos permitidos para antibióticos en leche

Límites máximos de residuos para Bencilpenicilina/Bencilpenicilina procainica

Especie	Tejido	LMR	Año de adopción	Nota
Vacuno/Vaca	Leche	4 µg/l	1999	

Límites máximos de residuos para Clortetraciclina/Oxitetraciclina/Tetraciclina

Especie	Tejido	LMR	Año de adopción	Nota
Vacuno/Vaca	Leche	100 µg/l	2003	

Fuente: CODEX ALIMENTARIOS. 2011.

Cuadro A – 3. Ingesta Diaria Admisible de residuos de antibióticos en leche.

Compuesto	IDA (Ingesta diaria admisible)	Definición del residuo
Bencilpenicilina/Bencilpenicilina Procaínica	30 µg de penicilina por persona por día	Bencilpenicilina
Clortetraciclina/Oxitetraciclina/Tetraciclina	0-30 µg/kg de peso corporal. Una IDA de grupo para clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina.	Compuesto originario, solo o combinado

Fuente: CODEX ALIMENTARIUS. 2011.

Cuadro A – 4. Tiempo de eliminación de antibióticos en el cuarto tratado

Intervalo (horas) en que se elimina el antibiótico	Antibiótico
<= 40	amoxicilina
50-70	bencilpenicilina, cefalexina, cloxacilina
70-90	ampicilina, lincomicina, cefquinoma, cefoperazona, penetamato
25 - 31	kanamicina, cefalexina, gentamicina
35-49	amoxicilina, cloxacilina, bencilpenicilina, lincomicina y cefoperazona
62 - 74	Cefquinoma, ampicilina y penetamato

Fuente: Instituto Lactológico de Lekunberri. 2004.

Cuadro A – 5. Valores a los que se les aplicó transformación logarítmica (Tetraciclina)

TABLA 2. VALORES A LOS QUE SE LES APLICÓ TRANSFORMACIÓN LOGARÍTMICA

Semana	Ganaderías					Leche Procesada	
	GA	GB	GC	GD	GE	LPX	LPY
1	3.0488	2.4683	3.0580	1.5315	2.5843	3.9341	3.7901
2	2.8351	2.4409	3.0580	1.8573	2.6474	3.9167	3.9365
3	2.9365	2.8274	2.7466	2.6107	2.5302	2.6522	3.7226
4	2.5977	2.4594	2.5635	2.5977	2.1584	3.7266	3.7065
5	2.9713	2.7952	2.7825	2.8096	1.7324	3.8573	3.9130

Cuadro A – 6. Valores transformados y multiplicados por el factor (100) (Tetraciclina)

TABLA 3. VALORES TRANSFORMADOS Y MULTIPLICADOS POR EL FACTOR (100)

Semana	Ganaderías					Leche Procesada	
	GA	GB	GC	GD	GE	LPX	LPY
1	304.88	246.83	305.80	153.15	258.43	393.41	379.01
2	283.51	244.09	305.80	185.73	264.74	391.67	393.65
3	293.65	282.74	274.66	261.07	253.02	265.22	372.26
4	259.77	245.94	256.35	259.77	215.84	372.66	370.65
5	297.13	279.52	278.25	280.96	173.24	385.73	391.30
X	287.79	259.82	284.17	228.14	233.05	361.74	381.37
Xon-1	17.44	19.51	21.42	55.45	38.47	54.57	10.64

Cuadro A – 7. Valores a los que se les aplicó transformación logarítmica (β -lactámicos)

TABLA 6. VALORES A LOS QUE SE LES APLICO TRANSFORMACION LOGARITMICA

Semana	Ganaderías					Leche Procesada	
	GA	GB	GC	GD	GE	LPX	LPY
1	1.8035	3.1045	3.1323	1.7076	0.6234	2.8235	3.1186
2	2.6201	2.3579	2.4014	2.4728	2.4548	2.9657	3.2405
3	2.2480	2.3096	2.1761	2.4346	2.3747	2.7868	3.1411
4	1.7076	2.3802	2.4493	1.6532	1.7324	2.7952	3.1455
5	1.5563	1.9542	1.6021	1.7709	1.7993	2.7372	3.2063

Cuadro A – 8. Valores transformados y multiplicados por el factor (10) (β -lactámicos)

TABLA 7. VALORES TRANSFORMADOS Y MULTIPLICADOS POR EL FACTOR

Semana	Ganaderías					Leche Procesada	
	GA	GB	GC	GD	GE	LPX	LPY
1	18.04	31.05	31.32	17.08	6.23	28.24	31.19
2	26.20	23.58	24.01	247.28	24.55	29.66	32.41
3	22.48	23.10	21.76	24.35	23.75	27.87	31.41
4	17.08	23.80	24.49	16.53	17.32	27.95	31.46
5	15.56	19.54	16.02	17.71	17.99	27.37	32.06
x	19.87	24.21	23.52	20.08	17.97	28.22	31.71
Xon-1	4.38	4.19	5.51	4.09	7.33	0.86	0.51

LISTA DE FIGURAS

Figura A – 1. Mapa del Departamento de La Paz (San Luis Talpa)

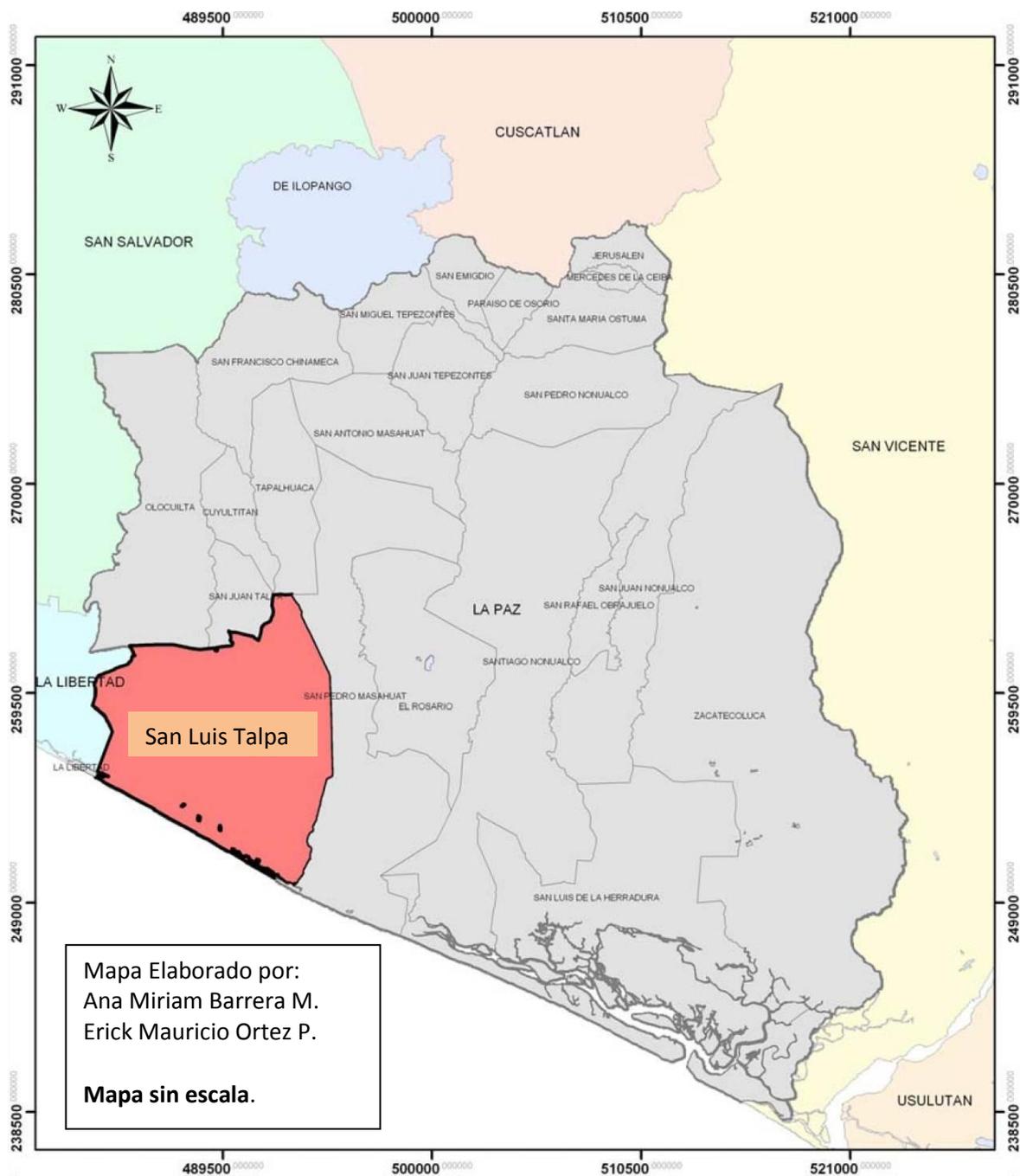


Figura A – 2 Ganadería A



Figura A – 3 Ganadería B



Figura A – 4 Ganadería C



Figura A - 5 Ganadería D



Figura A - 6 Ganadería E



Figura A - 7 Paquetes de Cristalería estéril



Figura A – 8 Preparación del inóculo



Figura A – 9 Recolección del inóculo de la Botella de Roux.



Figura A – 10 Material para preparación de diluciones de Solución Stock.



Figura A – 11 Diluciones para Curva Estándar



Figura A – 12 Curva Estándar de β -lactámicos

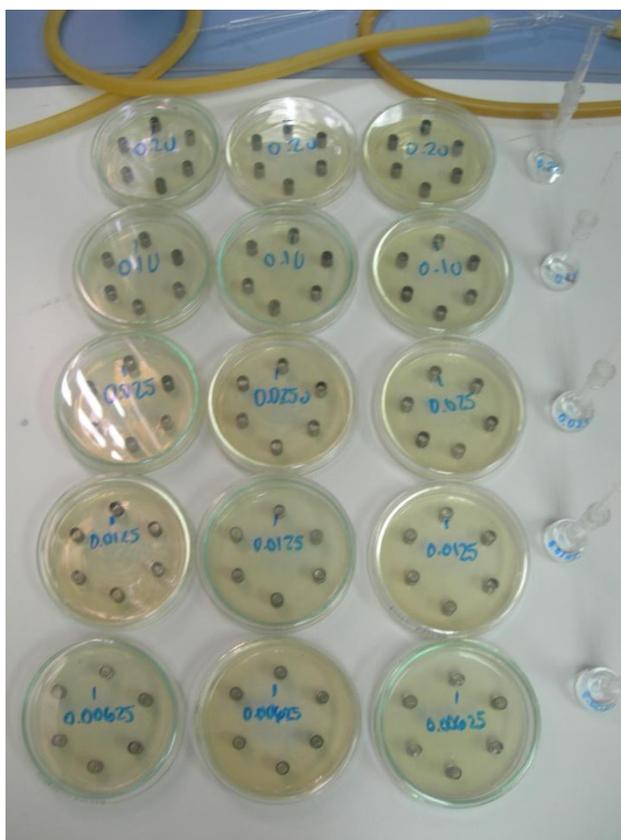


Figura A – 13 Muestras de leche proveniente de las Ganaderías.



Figura A – 14 Placas con Muestras de leche de Ganadería

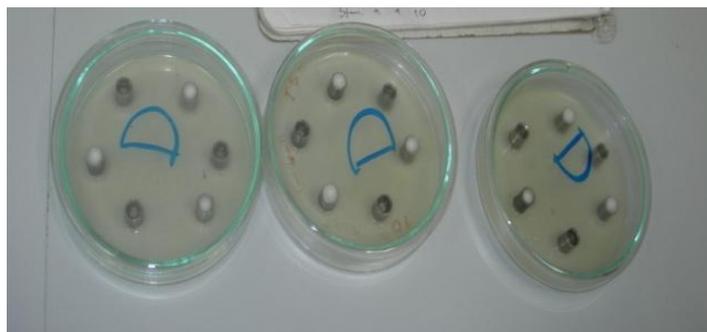


Figura A – 15 Medición de halos de Inhibición



LISTA DE FIGURAS

Figura A - 16. Preparación del *Micrococcus luteus* o *Staphylococcus aureus*

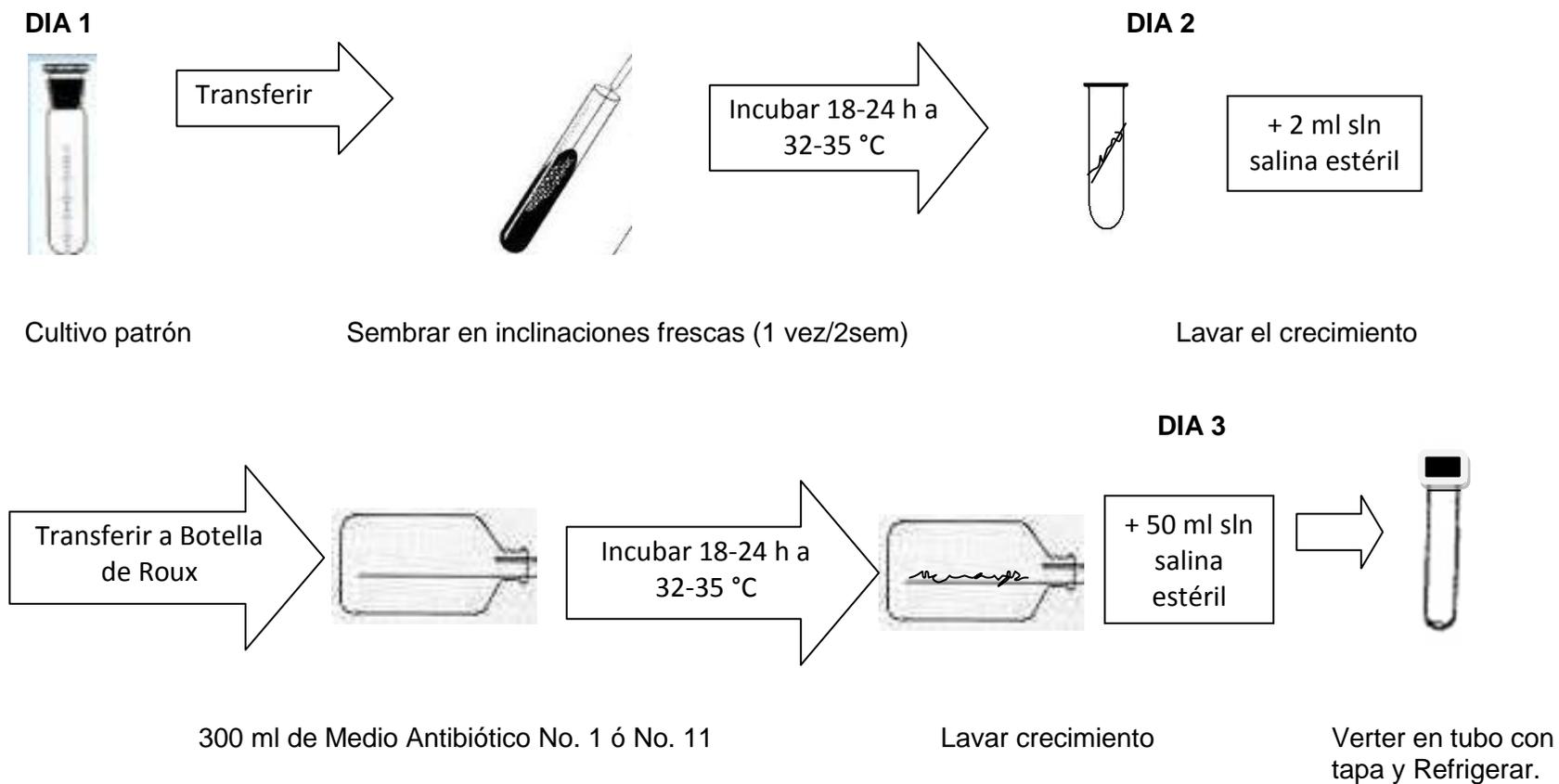


Figura A – 17. Preparación de placas petri

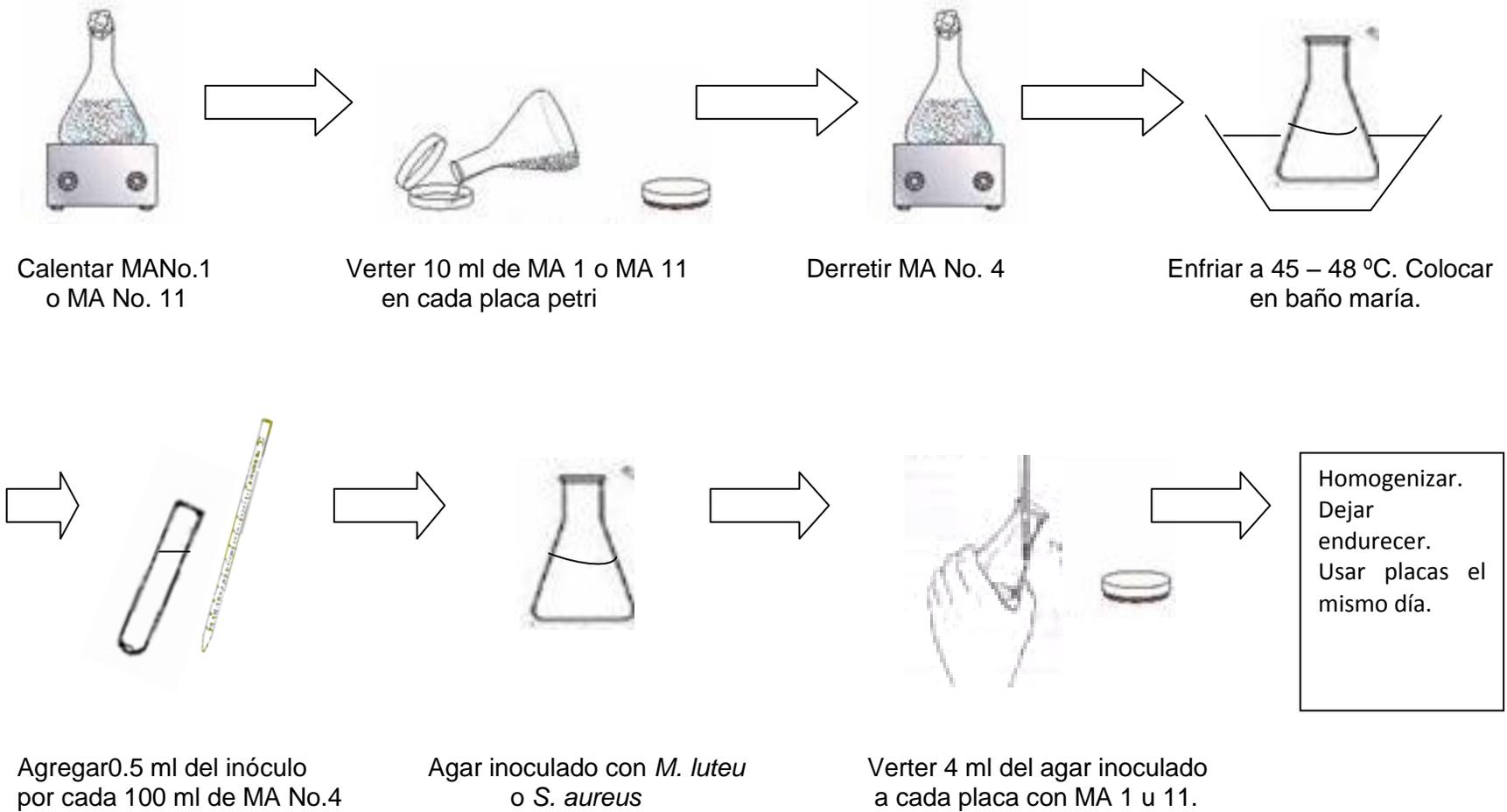
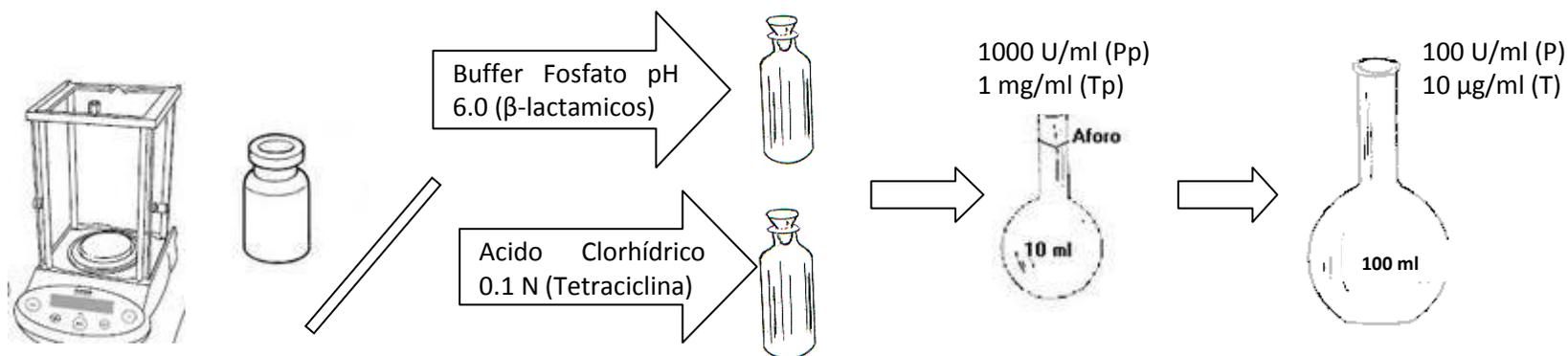


Figura A – 18. Preparación de las diluciones para la curva estándar



Pesar los mg de sustancia pura de Penicilina G Benzatínica (8.44 mg) o de Tetraciclina HCl (10.2 mg)

Diluir polvo de antibiótico en 10 ml de diluyente control

Pipetear 1 ml Solución Patrón. Verter en balón de 100 ml. Aforar con agua destilada.

Usar micropipetas c/ puntas
Para verter dilución 1:100.
Concentraciones de referencia
balones de 10 ml

Duración de Solución Patrón:
β-lactámico 2 días y
Tetraciclina 1 día.

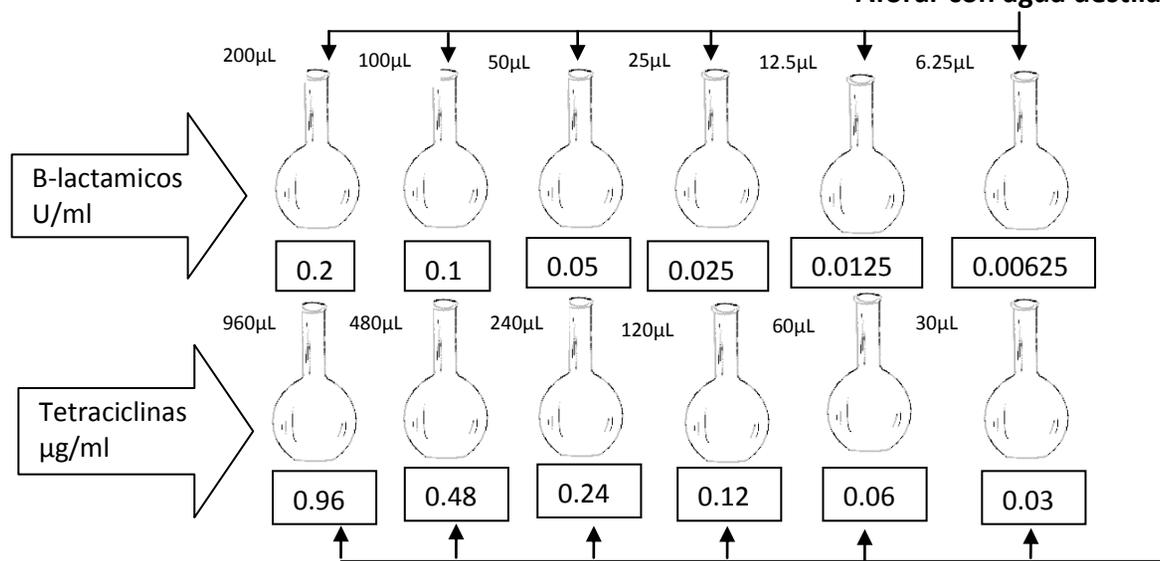


Figura A – 19. Preparación de las placas petri para la curva estándar

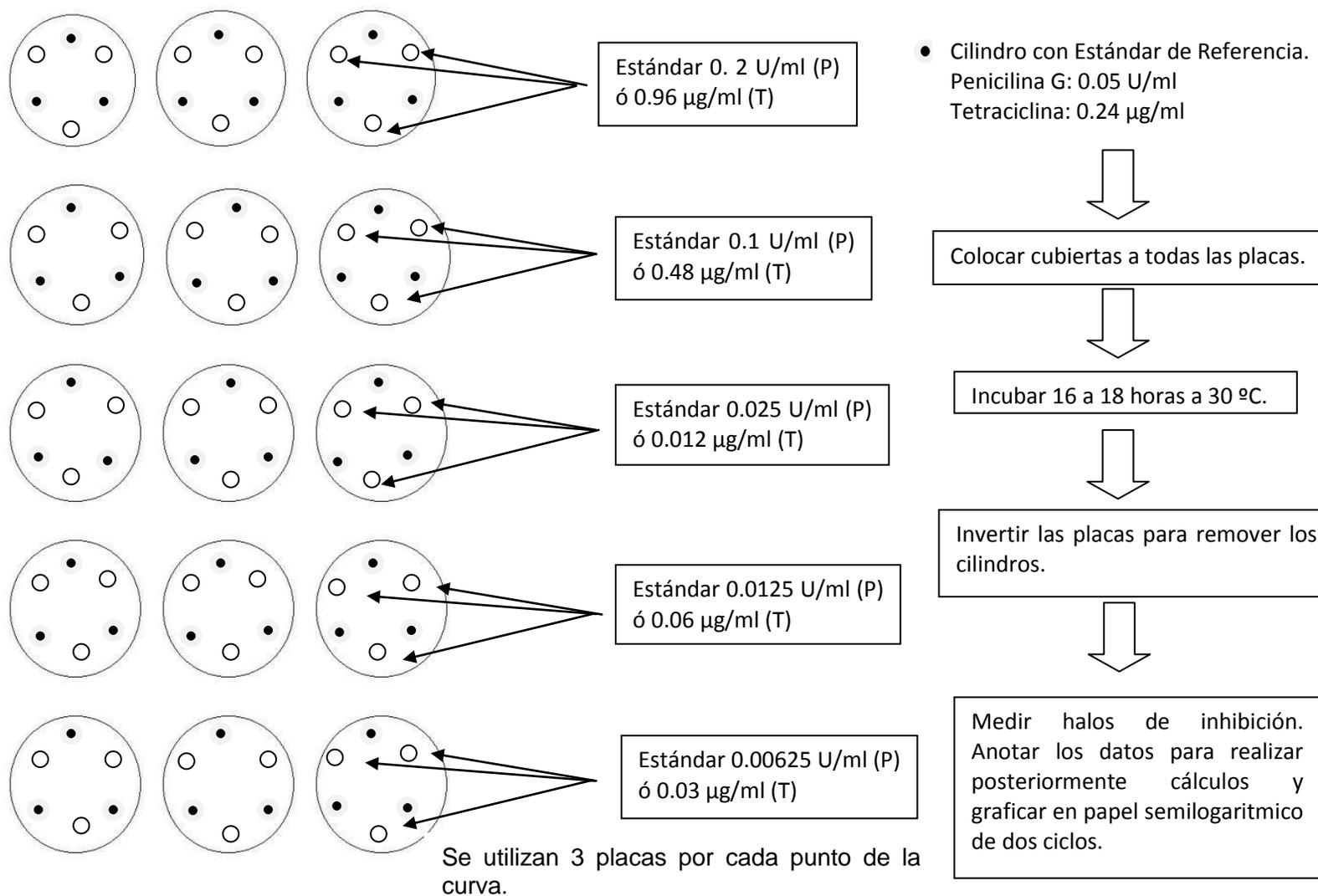


Figura A – 20. Preparación de la muestra

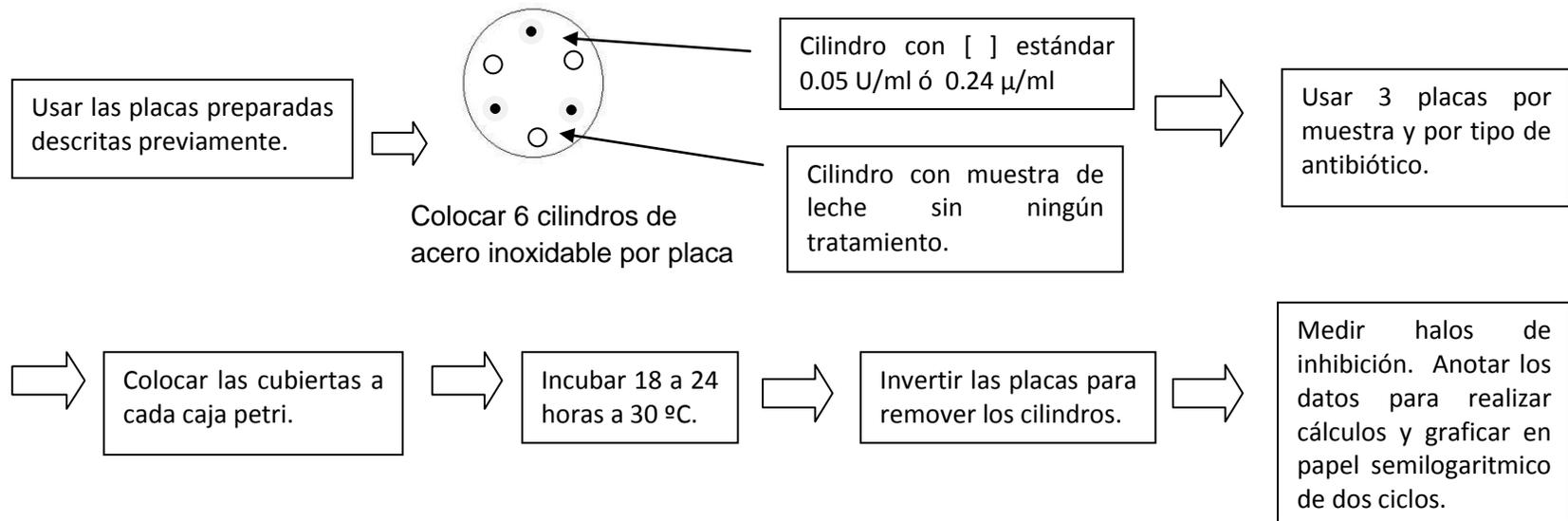


Figura A – 21. Calculo de potencia

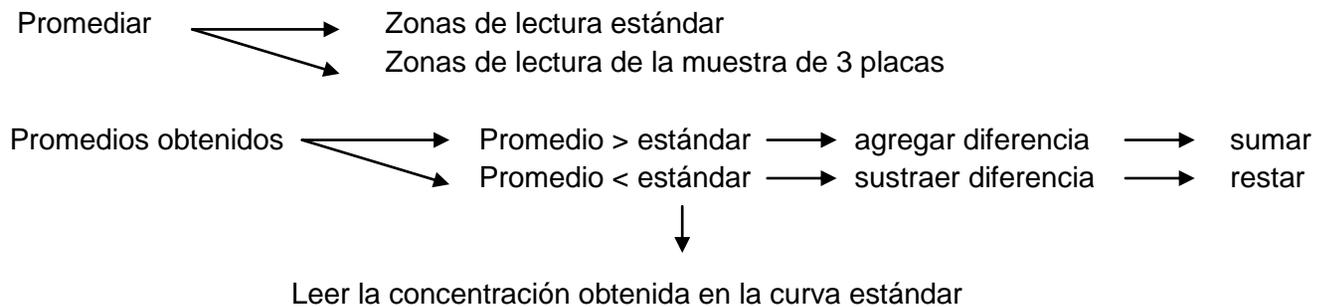


Figura A – 22 Hoja de cálculo: Diámetros de halos inhibición Curva Estándar β-lactámicos

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE CRUDA (X) PASTEURIZADA ()			METODO CILINDRO PLACA: RESULTADOS DE LA CURVA ESTÁNDAR		
Nombre del estándar: <i>Penicilina G Benzatinica.</i>			Estándar de referencia ()		
Potencia:					
Microorganismo de prueba: <i>Micrococcus luteus</i>					
Fecha: <i>24/Oct/11</i>					
LECTURA DIAMETROS DE HALOS DE INHIBICION (mm)					
Estándar (C) _E : 0.05U/ml	Estándar (E): 0.2 U/ml	Estándar(C) _B :0.05U/ml	Estándar (D): 0.1 U/ml	Estándar (C) _B : 0.05 U/ml	Estándar (B): 0.0.025U/ml
11	13	10	10	12	10
11	12	11	12	10	12
10	14	12	12	12	10
11	12	11	10	10	10
10	12	10	12	12	9
11	13	10	12	11	10
10	14	12	11	11	11
11	12	11	12	11	9
12	13	12	12	12	10
PROMEDIO					
10.78	12.89	11.00	11.44	11.22	10.11
Estándar (C) _A : 0.05 U/ml	Estándar (A): 0.0125U/ml	Estándar (C) _{Control} :0.05U/ml	Control (-): 0.00625U/ml	INFORMACION PARA GRAFICAR	
9	8	10	9	L= <u>9.26</u> mm []= _____	
11	9	11	8		
10	9	11	10	H= <u>12.51</u> mm []= _____	
11	9	10	9		
11	10	10	8		
11	9	9	8		
9	10	10	8		
11	10	10	9		
11	9	10	8		
PROMEDIO					
10.44	9.22	10.11	8.56		

Figura A – 23. Hoja de cálculo: Diámetros de halos inhibición de Muestras de Leche Cruda

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE CRUDA (X) PASTEURIZADA ()			METODO CILINDRO PLACA: RESULTADOS DE LAS MUESTRAS		
Nombre del Estándar: <u>Penicilina G Benzatinica.</u>			Estandar de Referencia ()		
Potencia:					
Microorganismo de prueba: <u>Micrococcus luteus</u>					
Fecha: <u>27/oct/11</u>					
LECTURA DIAMETROS DE HALOS DE INHIBICION (mm)					
Estándar (C): 0.05U/ml	MUESTRA: <u>101</u>	Estándar (C): 0.05U/ml	MUESTRA: <u>202</u>	Estándar (C): 0.05U/ml	MUESTRA: <u>303</u>
12	19	12	14	10	15
10	19	10	13	9	15
11	18	10	13	11	14
9	16	13	14	11	13
9	17	10	15	9	13
10	18	12	15	9	12
11	18	12	14	11	14
12	19	11	15	11	13
10	18	10	14	12	13
PROMEDIO					
<u>10.44</u>	<u>18.00</u>	<u>11.11</u>	<u>14.11</u>	<u>10.33</u>	<u>13.56</u>
Estándar (C): 0.05U/ml	MUESTRA: <u>404</u>	Estándar (C): 0.05 U/ml	MUESTRA: <u>505</u>	Estándar(C): 0.05 U/ml	CONTROL
12	16	12	15	13	9
9	16	10	16	12	10
10	13	10	16	12	9
10	16	11	15	10	8
9	13	12	15	11	8
10	16	12	14	10	8
9	16	11	16	10	8
11	14	12	16	10	8
11	15	10	16	12	9
PROMEDIO					
<u>10.11</u>	<u>15.00</u>	<u>11.11</u>	<u>15.44</u>	<u>11.11</u>	<u>8.56</u>
INFORMACION PARA GRAFICAR			OBSERVACIONES:		
L= <u>9.26</u> mm []= _____					
H= <u>12.51</u> mm []= _____					
PROMEDIO PUNTO CENTRAL CALCULADO: _____			PUNTO CENTRAL GRAFICADO: _____		

Figura A – 24. Hoja de cálculo: Corrección de estándares β -lactámicos

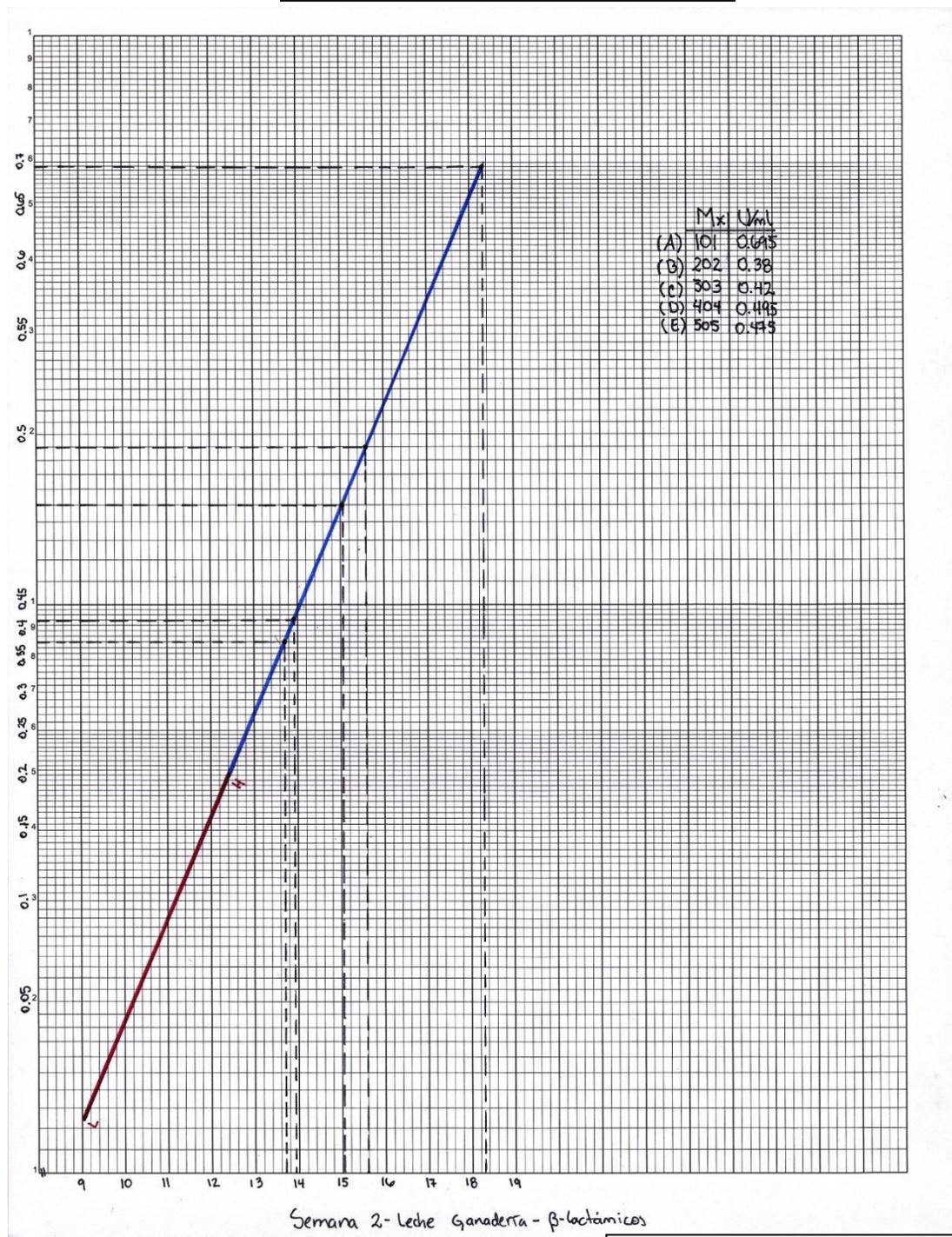
Determinación de antibióticos en Leche CRUDA (X) PASTEURIZADA ()		HOJA DE CÁLCULO		
Antibiótico de prueba: β -lactámicos		Microorganismo de prueba: <i>M. luteus</i>		
CÁLCULO DE CORRECCIÓN DE ESTÁNDARES				
CE = 97/9	CD = 99/9	CB = 101/9	CA = 94/9	C cont = 91/9
E = 116/9	D = 103/9	B = 91/9	A = 83/9	Cont (-) = 77/9
CE = 10.78	CD = 11	CB = 11.22	CA = 10.44	C cont = 10.11
E = 12.89	D = 11.44	B = 10.11	A = 9.22	Cont (-) = 8.56
C = 10.71				
FACTOR DE CORRECCIÓN (FCo = C - CE, CD, CB, CA)				
CE	CD	CB	CA	
FCo = 10.71 - 10.78	FCo = 10.71 - 11	FCo = 10.71 - 11.22	FCo = 10.71 - 10.44	
FCo = -0.07	FCo = -0.29	FCo = -0.51	FCo = 0.27	
VALORES CORREGIDOS (E, D, B, A + Fco)				
E	D	B	A	
12.89 + (-0.07)	11.44 + (-0.29)	10.11 + (-0.51)	9.22 + 0.27	
12.82	11.15	9.60	9.49	
FECHA: <u>24/oct/11</u>				
SEMANA DE TRABAJO: <u>II</u>				
SIMBOLOGIA UTILIZADA:				
C= Diámetro promedio (mm) de 45 lecturas de los halos obtenidos con la solución estándar de concentración media.				
FCo= Factor de corrección				
A, B, D, E = Diámetros promedio (mm) del estándar más bajas y más altas respectivamente.				

Figura A – 25 Hoja de cálculo: Concentración Media del estándar, L y H.

Determinación de antibióticos en Leche CRUDA (X) PASTEURIZADA ()		HOJA DE CÁLCULO	
Antibiótico de prueba: β -lactámicos		Microorganismo de prueba: <i>M. luteus</i>	
CÁLCULO DE DIAMETRO DE HALOS DE LA CONCENTRACIÓN MEDIA DEL ESTÁNDAR			
$c = \frac{10.78 + 11 + 10.11 + 11.22 + 10.44}{5}$			
$c = 10.71$			
DIAMETRO PROMEDIO CORREGIDO PARA EL ESTÁNDAR A LAS CONCENTRACIONES A, B, D, E [[c - Xc) + Xi]			
(E)	(D)	(B)	(A)
<u>12.89</u> e = <u>12.82</u>	<u>11.44</u> d = <u>11.15</u>	<u>10.11</u> b = <u>9.60</u>	<u>9.22</u> a = <u>9.49</u>
$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$ $L = \frac{3(9.49) + 2(9.60) + 10.71 - 12.82}{5}$ $L = \frac{45.56}{5}$ $L = 9.11$		$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$ $H = \frac{3(12.82) + 2(11.15) + 10.71 - 9.49}{5}$ $H = \frac{61.98}{5}$ $H = 12.40$	
FECHA: <u>24/oct/2011</u> SEMANA DE TRABAJO: <u>II (Dos)</u>			
SIMBOLOGIA UTILIZADA: C= Diámetro promedio (mm) de 45 lecturas de los halos obtenidos con la solución estándar de concentración media. a, b, d, e = Diámetros promedio (mm) corregidos para las concentraciones más bajas y más altas del estándar respectivamente. L= Diámetro de halos (mm) calculado para la concentración más baja de la gráfica respuesta. H= Diámetro de halos (mm) calculado para la concentración más alta de la gráfica respuesta. i = Estándar a, b, c ó d respectivamente. X= Promedio de halos de inhibición (mm)			

Figura A – 26 Grafico: Curva Estándar y Muestras de Leche Cruda β -lactámicos.

Papel Semilogarítmico de dos ciclos.



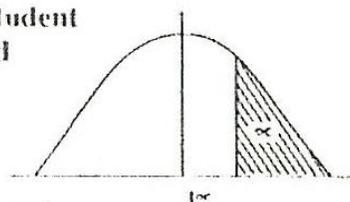
(L - H)



(Muestras de Ganaderías)



Figura A – 27 Distribución para t de Student

Tabla de distribución t de Student
con v grados de libertad

v	t _{.45}	t _{.40}	t _{.30}	t _{.25}	t _{.20}	t _{.10}	t _{.05}	t _{.025}	t _{.01}	t _{.005}
1	.158	.325	.727	1.000	1.376	3.08	6.31	12.71	31.82	63.66
2	.142	.289	.617	.816	1.061	1.89	2.92	4.30	6.96	9.92
3	.137	.277	.584	.765	.978	1.64	2.35	3.18	4.54	5.84
4	.134	.271	.569	.741	.941	1.53	2.13	2.78	3.75	4.60
5	.132	.267	.559	.727	.920	1.48	2.02	2.57	3.36	4.03
6	.131	.265	.553	.718	.906	1.44	1.94	2.45	3.14	3.71
7	.130	.263	.549	.711	.896	1.42	1.90	2.36	3.00	3.50
8	.130	.262	.546	.706	.889	1.40	1.86	2.31	2.90	3.36
9	.129	.261	.543	.703	.883	1.38	1.83	2.26	2.82	3.25
10	.129	.260	.542	.700	.879	1.37	1.81	2.23	2.76	3.17
11	.129	.260	.540	.697	.876	1.36	1.80	2.20	2.72	3.11
12	.128	.259	.539	.695	.873	1.36	1.78	2.18	2.68	3.06
13	.128	.259	.538	.694	.870	1.35	1.77	2.16	2.65	3.01
14	.128	.258	.537	.692	.868	1.34	1.76	2.14	2.62	2.98
15	.128	.258	.536	.691	.866	1.34	1.75	2.13	2.60	2.95
16	.128	.258	.535	.690	.865	1.34	1.75	2.12	2.58	2.92
17	.128	.257	.534	.689	.863	1.33	1.74	2.11	2.57	2.90
18	.127	.257	.534	.688	.862	1.33	1.73	2.10	2.55	2.88
19	.127	.257	.533	.688	.861	1.33	1.73	2.09	2.54	2.86
20	.127	.257	.533	.687	.860	1.32	1.72	2.09	2.53	2.84
21	.127	.257	.532	.686	.859	1.32	1.72	2.08	2.52	2.83
22	.127	.256	.532	.686	.858	1.32	1.72	2.07	2.51	2.82
23	.127	.256	.532	.685	.858	1.32	1.71	2.07	2.50	2.81
24	.127	.256	.531	.685	.857	1.32	1.71	2.06	2.49	2.80
25	.127	.256	.531	.684	.856	1.32	1.71	2.06	2.48	2.79
26	.127	.256	.531	.684	.856	1.32	1.71	2.06	2.48	2.78
27	.127	.256	.531	.684	.855	1.31	1.70	2.05	2.47	2.77
28	.127	.256	.530	.683	.855	1.31	1.70	2.05	2.47	2.76
29	.127	.256	.530	.683	.854	1.31	1.70	2.04	2.46	2.76
30	.127	.256	.530	.683	.854	1.31	1.70	2.04	2.46	2.75
40	.126	.255	.529	.681	.851	1.30	1.68	2.02	2.42	2.70
60	.126	.254	.527	.679	.848	1.30	1.67	2.00	2.39	2.66
120	.126	.254	.526	.677	.845	1.29	1.66	1.98	2.36	2.62
∞	.126	.253	.524	.674	.842	1.28	1.645	1.96	2.33	2.58

maño de la muestra es $n = 15$ ($v = n - 1 = 15 - 1 = 14$) hay una confianza de 0.90 de que el parámetro μ esté en el intervalo.

$$\bar{X} \pm 1.76 \cdot \frac{S}{\sqrt{n-1}}$$