



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y**  
**ZOOTECNIA**



**“PRUEBA BIOLÓGICA DE CRIBADO PARA DETECTAR  
RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE BOVINA”**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Bach. ALEXIS IVAN HUAMAN APAZA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**PUNO – PERÚ**

**2020**



## DEDICATORIA

Este trabajo de investigación va dedicado especialmente a mis padres Toribio e Hilda, por su constante amor y paciencia que me brindaron durante todos estos años.

A mis hermanos David, Mayra, Carmen, Anthony y Ervin, por su apoyo y comprensión incondicional durante todos estos años.



## AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios, quien me ayudó a forjar mi camino día a día.

Gracias a la Universidad Nacional del Altiplano, la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, y a todos sus docentes, por haberme permitido formarme profesionalmente.

A mis padres, hermanos quienes me apoyaron en todo momento.

Un infinito agradecimiento al Dr. Alberto Ccama, por su grandiosa paciencia, enseñanza, y asesoría en esta etapa final universitaria.

A los docentes miembros del jurado, por sus sugerencias, consejos para la culminación del trabajo de investigación.



# ÍNDICE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**ÍNDICE DE TABLAS**

**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

**RESUMEN ..... 9**

**ABSTRACT..... 10**

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

**1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN ..... 12**

1.1.1 OBJETIVO GENERAL:..... 12

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: ..... 12

## **CAPITULO II**

### **REVISIÓN DE LITERATURA.**

**2.1 ANTECEDENTES ..... 14**

**2.2 MARCO TEÓRICO ..... 15**

2.2.1 La leche ..... 15

2.2.2 Mastitis..... 20

2.2.3 Antibióticos..... 22

2.2.4 Residuos de antibióticos en leche ..... 27

2.2.5 Métodos para detectar residuos de antibióticos ..... 31

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

**3.1 UBICACIÓN ..... 37**

**3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL ..... 37**

3.2.1 Tamaño de muestra ..... 37

3.2.2 Materiales y reactivos de laboratorio ..... 38

3.2.3 Equipos ..... 38

3.2.4 Cultivos ..... 38

**3.3 METODOLOGÍA ..... 39**

3.3.1 Procedimiento para determinar la bacteria más sensible a los  
antimicrobianos más utilizados en ganadería. .... 39



3.3.2	Procedimiento para determinar la concentración inhibitoria mínima de tres antibióticos de la bacteria sensible. ....	40
3.3.3	Procedimiento para determinar la sensibilidad y especificidad del método microbiológico propuesto. ....	42
3.3.4	Procedimiento para determinar la presencia de residuos de antibióticos en leche expendida. ....	44

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1.	<b>Determinación de la bacteria más sensible a los antibióticos más utilizados en ganadería. ....</b>	<b>45</b>
4.2.	<b>Determinación de la concentración inhibitoria mínima de tres antibióticos de la bacteria sensible. ....</b>	<b>47</b>
4.3.	<b>Determinación de la especificidad, sensibilidad y valor predictivo positivo y negativo del método biológico. ....</b>	<b>48</b>
4.4.	<b>Determinación de antibióticos en leche expendida en los mercados de la ciudad de puno ..... </b>	<b>51</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>		<b>55</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>		<b>56</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>		<b>57</b>
<b>ANEXOS.....</b>		<b>65</b>

**Área: Producción Animal.**

**Tema : Detección de antibióticos en leche.**

**Fecha de sustentación: 16 de enero del 2020**



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1 Coloración del indicador orgánico.(Negativo-dudoso-positivo).....	65
---	----



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Requisitos físico-químicos que debe cumplir la leche .....	18
Tabla 2	Requisitos microbiológicos. ....	18
Tabla 3.	Requisitos de calidad higiénica. ....	19
Tabla 4	Límites Máximos de Residuos(LMR) de antimicrobianos para la leche de vaca.....	19
Tabla 5	Bacteria más sensible a los antibióticos más utilizados en ganadería. ....	45
Tabla 6	Cultivo de B. subtilis a diferentes concentraciones de Penicilina.....	47
Tabla 7	Cultivo de B. subtilis a diferentes concentraciones de Oxitetraciclina .....	47
Tabla 8	Cultivo de B. subtilis a diferentes concentraciones de Tilosina.....	47
Tabla 9.	Determinación de la sensibilidad del método biológico. ....	48
Tabla 10.	Determinación de la especificidad del método biológico. ....	49
Tabla 11	Determinación de la presencia de residuos de antibióticos en leche expendida en los mercados de la ciudad de Puno.....	51



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

- HPLC:** High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta eficacia)
- CIM:** Concentración mínima inhibitoria.
- FAO:** Food and Agriculture Organization (Organización para la Alimentación y la Agricultura).
- NTP:** Normas Técnicas Peruanas.
- UFC:** Unidades Formadoras de Colonias.
- UE:** Unión Europea.
- UI:** Unidad Internacional.
- LMR:** Límites máximos de residuos.
- OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- ELISA: Enzyme-** Linked Inmuno (Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas).
- uL/mL:** micro litros por mili litros.





## RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicada a una altitud de 3827 m.s.n.m.; el cual tuvo el objetivo de realizar una prueba biológica de cribado, para detectar residuos de antibióticos en leche fresca así como determinar la bacteria más sensible a una concentración mínima inhibitoria de tres tipos de antibióticos, de igual manera se determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la prueba microbiológica. Se utilizó el método experimental, para lo cual se cultivaron bacterias sensibles (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) en leche fresca, con cantidades conocidas de antibióticos (penicilinas, tilosina y oxitetraciclina) añadiendo un indicador colorimétrico, el cual fue púrpura de bromocresol 0.1% cultivándolas durante 24 H a 37°C. Se determinó que el *Bacillus subtilis* es la bacteria más sensible a los antibióticos, pudiendo ser sensible a concentraciones iguales a los LMR de penicilinas (4ug/Kg), oxitetraciclina (100ug/Kg) y tilosina (50ug/Kg); esta prueba microbiológica tuvo una sensibilidad mayor a 93.3%, una especificidad del 96.7%, y un valor predictivo positivo y negativo igual a 96.7%. Utilizando la prueba biológica propuesta se determinó la presencia de residuos de antibióticos en un porcentaje de 20.8% en leche vendida en los mercados de la ciudad de Puno. Por lo tanto, el método microbiológico propuesto es adecuado para detectar residuos de antibióticos en leche fresca.

**Palabras clave:** prueba microbiológica, *Bacillus subtilis*, antibióticos, leche.



## ABSTRACT

The research work was carried out in the Microbiology laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the National University of the Altiplano, located at an altitude of 3827 m.s.n.m .; which had the objective of validating a biological test, to detect antibiotic residues in fresh milk as well as to determine the most sensitive bacteria at a minimum inhibitory concentration of three types of antibiotics, in the same way the sensitivity, specificity, positive predictive value were determined and negative of the microbiological test. The experimental method was used, for which sensitive bacteria (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*) were grown in fresh milk, with known amounts of antibiotics (penicillins, tylosin and oxytetracycline) by adding a colorimetric indicator, which was bromocresol purple 0.1% cultivating them for 24 H at 37 ° C. It was determined that *Bacillus subtilis* is the bacterium most sensitive to antibiotics, with a sensitivity, specificity, positive and negative predictive value greater than 90%. Using the proposed biological test, the presence of antibiotic residues was determined in a percentage of 20.8% in milk sold in the markets of the city of Puno. Therefore the proposed microbiological method is suitable for detecting antibiotic residues in fresh milk.

**Keywords:** microbiological test, *Bacillus subtilis*, antibiotics, milk.



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La leche es un alimento complejo y de elevado valor nutritivo conjuntamente con sus derivados en una dieta equilibrada. En los mamíferos, ésta constituye una vía natural de eliminación para los antibióticos y sus metabolitos durante un período variable de tiempo, que depende tanto del animal tratado (especie, raza, edad, estado fisiológico) como del medicamento utilizado (formulación, dosis, tiempo y vía de tratamiento) (Rodríguez & Rodríguez, 1995).

La leche adulterada y sub productos con residuos de antibióticos constituye grave riesgo para la salud pública (Ortiz et al. 2011). Por otro lado, también se indica que los residuos de antimicrobianos presentes en la leche y derivados pueden causar efectos adversos en el consumidor como hipersensibilidad, alteraciones de la microflora intestinal, resistencia bacteriana (Briones 2005).

Las normas técnicas de INDECOPI, que regulan las condiciones y características que deben presentar los alimentos de consumo humano, para el caso de la leche indica en forma general que no debe contener sustancias que alteren las características de este producto, y en el caso de residuos de antibióticos se considera la ausencia de esta sustancia. Al respecto se tienen pruebas para detectar residuos de antibióticos en leche bovina y otros productos y sub productos de origen animal, entre los que tenemos los métodos microbiológicos. Los métodos microbiológicos están basados fundamentalmente en pruebas de inhibición del crecimiento de un microorganismo específico (microorganismo de prueba o “microorganismo test”), empleando para la detección de esta inhibición, diversos sistemas como indicadores de pH, redox, bioluminiscencia, etc., es decir, 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 (Kantiani et al. 2009; Pikemaat et al. 2009).

De lo expuesto anteriormente, los métodos para detectar residuos de antibióticos, tienen costos elevados y no se encuentran disponibles en nuestra zona, por lo que mediante el presente trabajo de investigación proponemos validar una prueba biológica de cribado, en el que se utilice un microorganismo sensible a antibióticos, determinando la concentración mínima inhibitoria (CIM) que es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación mediante cultivos y que contenga un indicador para diferenciar las muestras positivas de las negativas, con una alta sensibilidad y especificidad y altos valores predictivos positivos y negativos, así mismo con dicha prueba validada se determinará la presencia de residuos de antibióticos en leche fresca bovina expendida en la ciudad de Puno.

## **1.1 Objetivos de la investigación**

### **1.1.1 Objetivo general:**

- Realizar una prueba biológica de cribado para detectar residuos de antibióticos en leche bovina

### **1.1.2 Objetivos específicos:**

- Determinar el microorganismo más sensible a pequeñas cantidades de antibióticos y la sustancia indicadora adecuada.
- Determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la prueba propuesta.



- Determinar la presencia de residuos de antibióticos en leche bovina expendida en 450 la ciudad de Puno, mediante la prueba propuesta.



## CAPITULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA.

#### 2.1 Antecedentes

El método más usado para la evaluación de la detección de antibióticos es la Técnica Microbiológica de Cilindros en Placa, en la cual, se utiliza cepas de *Bacillus subtilis* BGA. Se utilizan diferentes antimicrobianos como penicilinas, tetraciclinas entre otros, posteriormente se evalúa la sensibilidad en placa de la bacteria frente a cada antibiótico a diferentes concentraciones (San Martín & Moraga, 1996).

Un estudio realizado mediante el Método de las 5 placas utilizó cepas de bacterias sensibles como *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* las cuales fueron cultivadas a diferente pH; fueron expuestas a diferentes antibacterianos de mayor oferta en Chile para vacas de lechería (penicilinas, oxitetraciclinas entre otros), de esta manera determinar a placa más sensible a cada uno de ellos, se determinó que las bacterias son sensibles a dos o más antibacterianos (Gatica & Gesche, 2007).

Un estudio realizado en la ciudad de Puno, sobre la validación de una prueba biológica para detectar residuos de antibióticos en quesos, expuso cepas sensibles de bacterias (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) a tres antibióticos (tilosina, penicilina y oxitetraciclina). Se determinó como la bacteria más sensible al *Bacillus subtilis* frente a cada antibiótico (Ticona, 2017).



Con la finalidad de validar una prueba microbiológica se realizó un Bioensayo para la detección de antimicrobianos en músculo bovino para lo cual se utilizaron microorganismos como *Kocuria rhizophila*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*; exponiéndolos a estos microorganismos a diferentes concentraciones de diferentes antibióticos, entre ellos a penicilinas, oxitetraciclinas entre otros, como resultado se evidenció la sensibilidad de los microorganismos a dichos antibióticos. Siendo este estudio aplicable a la detección de una amplia gama de residuos antimicrobianos en músculo bovino. (Vela et al., 2014)

Dos estudios realizados en Puno para la determinación de antibióticos en carne bovina de los camales de la zona, usaron métodos microbiológicos para lo cual cultivaron *Bacillus subtilis*, exponiendo a estas bacterias a una muestra de diafragma de carne de res. Dichos estudios encontraron presencia de antibióticos en carne. Por lo cual se demostró la eficacia del *Bacillus subtilis* a la detección de antimicrobianos (Paredes, 2018) ;(Aguilar, 2018).

## 2.2 Marco teórico

### 2.2.1 La leche

La leche es el primer y único alimento que ingieren los mamíferos. Es un producto nutritivamente muy completo y aporta las proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales que el recién nacido necesita para sobrevivir y para crecer (León, 2013).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación FAO (Food and Agriculture Organization), la leche es el producto de la secreción mamaria, obtenido por uno o varios ordeños, sin adición o sustracción alguna. (Kastenmayer P. 1995)



Es el producto íntegro no alterado ni adulterado del ordeño higiénico, regular y completo de vacas sanas y bien alimentadas, sin calostro y exento de color, olor, sabor y consistencia anormales y que no ha sido sometido a procesamiento o tratamiento alguno. La designación de “leche” sin especificaciones de la especie productora corresponde exclusivamente a la leche de vaca mientras que a las leches obtenidas de otras especies les corresponde, la denominación de leche, pero seguida de la especificación del animal productor (NTP 202.001:2003).

Debido a su alto valor nutritivo, las leches, en general, representan el alimento más balanceado y apropiado para el consumo. Además de proporcionar prácticamente todos los nutrientes necesarios, también contienen diferentes sustancias que actúan como parte fundamental de los sistemas inmunológico y de protección (Badui, 2006).

- **Calidad de la leche.**

Cuando se considera a la leche desde el punto de la calidad se utiliza un vocablo de alcance muy general en el que van comprendidas, su composición, los diversos elementos que la constituyen, el sabor y el aroma, la posible presencia en ella de sustancias extrañas, la cantidad de microorganismos presentes (patógenos o no) y la acción de los mismos, las condiciones sanitarias del lugar de producción y la manipulación higiénica de la leche desde el lugar de producción al de consumo (González, Vega, & Castillo, 2002).





Una leche de buena calidad debe reunir las siguientes características: adecuada composición (contenidos de proteína, grasa, sólidos totales, minerales y vitaminas), no contener un número excesivo de microorganismos ( $<50.000$  UFC/mL), estar libre de sustancias extrañas (calostro, sedimentos) y de residuos químicos e inhibidores (antibióticos, pesticidas y otros), ausencia de cuerpos extraños y de agentes patógenos (brucelosis, tuberculosis, paratuberculosis y *Salmonella*, entre otros), y poseer adecuadas características organolépticas (sabor y olor normales) (Cabrera et al., 2003; Cotrino & Gaviria, 2003).

- **Calidad composicional e higiénica de la leche**

Según la NTP 202.001 (2003) la leche cruda deberá estar exenta de sustancias conservadoras y de cualquier otra sustancia extraña a su naturaleza y no podrá haber sido sometida a tratamiento alguno que disminuya o modifique sus componentes originales.

La Tabla 1 se indica los requisitos físico-químicos que debe cumplir la leche cruda:



Tabla 1 Requisitos físico-químicos que debe cumplir la leche

ENSAYO	REQUISITO
Materia grasa (g/100g)	Mínimo 3.2
Sólidos no grasos (g/100g)	Mínimo 8.2
Sólidos totales (g/100g)	Mínimo 11.4
Acidez, expresada en g. de ácido láctico (g/100g)	0.14-0.18
Densidad a 15°C (g/mL)	1.0296-1.0340
Índice de refracción del suero, 20°C	Mínimo 1.34179
Ceniza total (g/100g)	Máximo 0.7
Alcalinidad de la ceniza total (mL de Solución de NaOH 1 N)	Máximo 1.7
Índice crioscópico	Máximo -0.540°C
Sustancias extrañas a su naturaleza	Ausencia
Prueba de alcohol (74 % v/v)	No coagulable
Prueba de la reductasa con azul de metileno	Mínimo 4 horas

Fuente: NTP 202.001 (2003)

En la Tabla 2 se indica los requisitos microbiológicos que debe cumplir la leche cruda:

Tabla 2 Requisitos microbiológicos.

ENSAYO	REQUISITO
Numeración de microorganismos Mesófilos aerobios y facultativos viables ufc/mL	Máximo 1 000 000
Numeración de coliformes ufc/mL	Máximo 1 000

Fuente: NTP 202.001 (2003)

En la Tabla 3 se indica los requisitos de calidad higiénica que debe cumplir la leche cruda:

Tabla 3. Requisitos de calidad higiénica.

ENSAYO	REQUISITO
Conteo de células somáticas/ mL	Máximo 5000 000

Fuente: NTP 202.001 (2003)

La comunidad europea, por medio de la directiva 96/23/CE, que establece la obligatoriedad de detectar la presencia de residuos de medicamentos veterinarios y otras sustancias como pesticidas, micotoxinas, etc. en todos los productos de origen animal destinados al consumo humano, dentro de un plan nacional de vigilancia de residuos. La normativa peruana a través de la NTP 202.001 (2003) no establece los límites máximos de residuos de antimicrobianos, por ello se considerará la norma de la Comunidad Europea.

En la Tabla 4 se indica los límites máximos de residuos de antimicrobianos para la leche de vaca:

Tabla 4 Límites Máximos de Residuos(LMR) de antimicrobianos para la leche de vaca.

ANTIMICROBIANOS	LMR( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )
Betalactámicos	4
Bencilpenicilina	
Tetraciclina	100
Oxitetraciclina	
Macrolidos/ lincosamidas	50
Tilosina	

Fuente: Reglamentos UE (2010)



- **Inhibidores en la leche.**

Los residuos o inhibidores en leche han sido definidos como toda sustancia química o biológica, que, al ser administrada o consumida por el animal, se elimina y/o permanece como metabolito en la leche, en la carne o en los huevos, con efectos nocivos para el consumidor (Cotrino, 2003).

### **2.2.2 Mastitis**

El término mastitis deriva del griego: *mastos* que significa glándula mamaria y del sufijo *itis* que significa inflamación. La mastitis se define como una inflamación de la glándula mamaria; empero, la inflamación es la respuesta de los tejidos productores de leche a una lesión traumática o a la presencia de microorganismos infecciosos que dañan el epitelio glandular de la ubre. La inflamación puede ser clínica o subclínica; puede presentar cambios patológicos localizados o generalizados en función a la magnitud de la enfermedad (Mellado, 2009). El propósito de la respuesta inflamatoria es destruir o neutralizar al agente ofensivo, reparar los tejidos dañados y retornar la glándula a su función normal (Ávila y Gutiérrez, 2010).

La mastitis bovina es considerada la enfermedad infecciosa del ganado lechero de mayor impacto económico mundial, siendo *Staphylococcus aureus* el principal agente patógeno en muchos países. Si bien existen métodos para prevenir y controlar la mastitis bovina, la terapia con antibióticos desempeña un papel determinante en la eliminación de infecciones, aun cuando esta práctica lleve a la selección de cepas resistentes que intervienen de manera negativa en el tratamiento. (Pellegrino et al., 2011)



La ocurrencia de la mastitis bovina dependerá de la interacción entre la vaca, el agente etiológico, el medio ambiente y el hombre. Las vacas aportan la presencia o ausencia de resistencia natural a la mastitis, estado de los mecanismos de defensa, la etapa de la lactancia y presencia de factores estresantes. Las bacterias determinan la virulencia, patogenicidad, resistencia a antibióticos y otros factores. El medio ambiente determina el diseño y función del establo, la sala de ordeño e instalaciones, tipos de pisos paredes y techos, métodos de limpieza y desinfección. El hombre es el responsable de la aplicación de la tecnología y de la toma de decisiones con respecto a las vacas, agentes etiológicos y para minimizar los efectos de medio ambiente (Manrique, 2003).

- **Etiología**

La mastitis es ocasionada por diversos agentes, así tenemos: *Streptococcus agalactiae*, *streptococcus dysgalactiae*, *streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus haemoliticus*, *Streptococcus viridans*, *Eschericha coli*, *Streptococcus lactis* (Aragón et al, 1990). Aquellos lugares donde se practican medidas higiénicas adecuadas y con la introducción de antibióticos, el *Streptococcus agalactiae*, han sido sustituidos por el *Staphylococcus aureus* (Blood et al, 1986).

- **Tratamiento**

Según Máttar, Calderón, Sotelo, Sierra, &Tordecilla (2009) refiere que los antibióticos y otros antimicrobianos se utilizan ampliamente en los tratamientos de la mastitis y otras enfermedades ya que constituye la principal herramienta terapéutica en el control y, en algunos casos, en la erradicación de enfermedades infecciosas de origen bacteriano en los diferentes sistemas de



crianza intensiva. Sin embargo, la gran mayoría de estos productos son susceptibles de dejar residuos en los alimentos procedentes de los animales que han sido tratados y de esta forma llegar a la población generando diversos efectos adversos.

### **2.2.3 Antibióticos.**

Desde 1945, Fleming prevé los riesgos potenciales ligados a la utilización de los antibióticos. Teme que su utilización a gran escala seleccione bacterias resistentes, en su laboratorio, observa que bacterias sensibles a la penicilina al comienzo del experimento consiguen multiplicarse en presencia de concentraciones crecientes del antibiótico. Consta que las bacterias sensibles habían sido destruidas y las bacterias resistentes se habían multiplicado sin límite (Embid, 2000).

El primer antibiótico natural fue la penicilina (1928), que es el ejemplo excluyente, al representar el primer escalón de un grupo enorme de drogas de gran actividad y uso extendido, y el inicio de una nueva etapa en la historia de la humanidad. A partir de la molécula de la penicilina se semi-sintetizaron muchos otros agentes, en la búsqueda de mejorar ciertas características que parecían deficitarias del antibiótico original. Así aparecieron las penicilinas ácido-resistentes, que se pueden administrar oralmente sin ser inactivadas por el ácido gástrico de los animales monogástricos y del hombre, como la penicilina V. También aparecieron las penicilinas penicilinasa resistentes, con capacidad de resistir el ataque de bacterias resistentes, productoras de enzimas que pueden inactivar la molécula madre, como es el caso de cloxacilina y meticilina. Se actuó, además sobre el espectro, que en el caso de la penicilina es relativamente estrecho. Así aparecieron ampicilina y amoxicilina, por ejemplo, drogas sintéticas que son



capaces de actuar sobre una variedad de bacterias sustancialmente mayor que la penicilina (Errecalde, 2004).

Los antibióticos en concentraciones sub terapéuticas, se utilizan en la producción animal para mejorar la conversión alimenticia, o como sustancias promotoras de crecimiento. Esta práctica está prohibida en algunos países, pues además de dejar residuos, contribuye a la aparición de resistencia bacteriana y puede causar daño al entorno dado que una parte de los antibióticos llega al medio ambiente y destruye los microorganismos necesarios para el crecimiento de algunas plantas (Rodríguez, 2003).

### **2.2.3.1 Betalactámicos**

Los betalactámicos son una familia de drogas que atacan la pared bacteriana, ejerciendo su efecto a través del bloqueo de su síntesis. Interfieren con la síntesis de peptidoglicano, elementos esenciales de la constitución de la pared. Los defectos de la pared celular llevan a la lisis bacteriana. Actúan solamente frente a microorganismos que están en crecimiento activo (Sumano,1997)

La presencia de un anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas (Sumano,1997).

- **Penicilinas**

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula



de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además, tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo betalactámico y que es la que define sus propiedades (Sumano, 1997).

Estos antibióticos no son relativamente tóxicos, inclusive a altas dosis; sin embargo, su uso frecuente conduce a la aparición de reacciones de hipersensibilidad que pueden definirse como aquellas donde aparece una respuesta inusual tras la administración de un medicamento o producto biológico (Alpízar, 2000).

Una unidad internacional (UI), es la actividad de la penicilina incluida en 0.6 µg de sal sódica, y, por lo tanto, 1 mg de dicha sal contendrá 1,667 UI de penicilina. Un mg de sal potásica contiene 1,595 UI. Un mg de la sal procaínica tiene una equivalencia de 1,000 UI (Sumano & Ocampo, 2006).

### **Tiempo de retiro**

Las compañías farmacéuticas fijan el tiempo de retiro de la leche, fundamentadas en las propiedades farmacocinéticas de las distintas formulaciones en vacas en ordeño, y en los estudios toxicológicos en humanos. En general, los períodos de retiro oscilan entre cuatro a seis días para los antibióticos más comúnmente administrados, y es raro que se eliminen residuos de antibióticos por un período mayor, que el tiempo de retiro declarado por el fabricante del fármaco (Parra & col., 2003).

#### **2.2.3.2 Macrólidos.**

Los macrólidos son un grupo numeroso de antibióticos producidos por diversas especies de *Streptomyces*, que comparten una estructura química característica (formada por una lactona macrocíclica y 2 ó 3 restos de





desoxiazucres, normalmente hexosas), un mecanismo de acción común y una actividad bacteriana elevada contra bacterias gram positivas especialmente la eficacia de alguno de estos antibióticos, algunos de ellos clásicos, como la eritromicina ha llevado al desarrollo de nuevos antibacterianos de última generación (como claritromicina, azitromicina o tilmicosina) con propiedades mejoradas, especialmente en cuanto al incremento de la actividad antibacteriana y la supresión de algunos efectos secundarios.

Debido a su estructura química es común, todos los macrólidos actúan bloqueando la síntesis de proteínas mediante inhibición de la translocación por unión reversible a la subunidad ribosómica de 50S. Parece demostrado que todos inhiben específicamente, al igual que el clorafenicol, la peptidiltransferasa. (Botana, 2002)

La Tilosina es un antibiótico perteneciente a este grupo; utilizado para combatir neumonía, septicemia hemorrágica, mastitis, conjuntivitis, leptospirosis, micoplasmosis, etc. en diversos animales domésticos como ovinos, caprinos, bovinos, cerdos y aves (Cárdenas & Asencios, 2008).

### **2.2.3.3 Tetraciclinas.**

Las tetraciclinas son uno de los grupos clásico de antibióticos de amplio espectro, ya que son efectivas contra bacterias gramnegativas, tanto aerobias como anaerobias, así como contra grampositivas, e incluso contra algunos protozoos. Como en muchos otros casos, el incremento de las resistencias en los patógenos más comunes, agravado por la utilización de estos antibióticos como promotores del crecimiento, ha limitado su uso terapéutico en los últimos años actualmente suelen utilizarse como antibióticos de primera elección preferentemente en rumiantes y ganado porcino, aunque también tienen



aplicaciones en diversos animales de compañía para el tratamiento de infecciones causadas sobre todo por bacterias *atípicas*, como rickettsias, chlamidias, micobacterias y micoplasmas. Tienen también algunas aplicaciones en acuicultura.

Existen actualmente una docena de compuestos derivados de la estructura básica. Algunos de ellos, como la tetracilcina, la clortetraciclina, la oxitetraciclina o la dimetil-clortetraciclina son sustancias naturales, mientras que otras como la metaciclina o la limeciclina son productos semi sintéticos. El grupo más reciente de tetraciclinas de tercera generación lo constituyen las glicilglicinas, alguna de las cuales está todavía en fase de desarrollo. Algunos compuestos del grupo como la rolitetraciclina, la limeciclina y la clortetraciclinas no se comercializan en todos los países.

Las tetraciclinas están perfectamente indicadas como agentes bacteriostáticos, inhibiendo la síntesis de proteínas en las células bacterianas. Dicha inhibición la llevan a cabo evitando la asociación entre el aminoacil-ARNt y el ribosoma, uniéndose las tetraciclinas específicamente a la subunidad de 30S del ribosoma. (Botana, 2002)

La Oxitetraciclina es un compuesto antibacteriano utilizado en el ganado lechero para tratar enfermedades infecciosas, como la mastitis y también como aditivo en la ración animal para mejorar la conversión alimenticia. El uso de las oxitetraciclinas puede acarrear la presencia de residuos de estos fármacos en la leche, principalmente si no se utilizan de acuerdo con las indicaciones y si no se respeta el período mínimo de eliminación de los antibióticos por la leche. La presencia de residuos de antibióticos en la leche interfiere en el proceso industrial de derivados, inhibiendo fermentos lácticos usados en la



producción de yogures y quesos, lo que, consecuentemente, causa serios perjuicios económicos (Denobile&Nascimento, 2004).

#### **2.2.4 Residuos de antibióticos en leche**

Los residuos de antibióticos se definen como sustancias farmacológicamente activas (principios activos y excipientes, productos de degradación y metabolitos) que permanezcan en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiera administrado el medicamento veterinario. La concentración esperada está en función de diversos factores, como el grado de absorción del medicamento a partir del tracto gastrointestinal, la dosis administrada, la farmacocinética del producto y el tiempo de espera o retirada, de forma que una de las razones más obvias para que se produzcan residuos por encima de los límites legislados, o límites máximos de residuos(LMR) se debe a la no adecuada observación de los periodos de espera recomendados, bien de forma deliberada o accidental (Camean & Reppeto, 2006).

La utilización de antibióticos en los animales destinados al consumo humano está muy extendida, tanto en el tratamiento y prevención de las enfermedades infecciosas, como en la estimulación de su crecimiento. Esta utilización requiere que se respeten unos tiempos de espera o periodos de supresión, antes de emplear la producción de leche, huevos y carne de animal, de manera que no permanezcan en estos productos los residuos del fármaco empleado (Bermudez *et al*, 2006).

Los residuos más problemáticos presentes en la leche, son los que se derivan de fármacos antibacterianos, hormonas promotoras del crecimiento, y de ciertos pesticidas, metales pesados y productos químicos. El uso de éstos compuestos, hace que tomen contacto con diferentes tejidos comestibles de los animales; así se ve expuesto a ellos el ser humano (McEwen, 1997).



#### **2.2.4.1. Implicancias en la industria láctea.**

Las bacterias lácticas son particularmente sensibles, a los antibióticos comúnmente usados en el tratamiento de mastitis, particularmente a la penicilina (Sánchez, 1997).

Entre los principales problemas que se presentan al procesar leche con residuos de antibióticos, están:

- Formación de una cuajada inadecuada durante la elaboración del queso, la cual induce una maduración anormal;
- Disminución de la producción de acidez durante el proceso de elaboración de productos fermentados:
- Disminución del crecimiento de los cultivos lácticos, cuando se propagan en leche en polvo reconstituida (Vallejo, 1993).

#### **2.2.4.2. Sustancias antimicrobianas controladas**

Entre los antimicrobianos cuyos residuos han sido evaluados por la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de expertos en aditivos alimentarios JECFA (JointExpertCommitteeonFoodAdditives), figuran: el cloranfenicol, los nitrofuranos, la sulfadimidina, el sulfatiazol, la bencilpenicilina, la oxitetraciclina, la espiramicina y la tilosina (Parra & col., 2003).

#### **2.2.4.3. Tiempo o período de retiro o supresión**

El tiempo o de retirada, es el período de tiempo necesario entre la última administración del medicamento veterinario a un animal en condiciones normales de empleo y la obtención de productos alimenticios de dicho animal a fin de proteger la salud pública garantizando que dichos productos alimenticios no contengan estos metabolitos. Los tiempos de



espera se instauraron como medida de seguridad alimentaria para el consumidor (Camean&Reppeto, 2006).

#### **2.2.4.4. Límite máximo de residuos**

El límite máximo de residuos (LMR) se define como la concentración máxima de residuo de una sustancia farmacológicamente activa que puede permitirse en los alimentos de origen animal. Este límite se establece para cada producto (carne, leche, huevos) y es específica para cada especie animal. En Perú se utiliza como referencia de los límites máximos permitidos de antibióticos en leche, las normas internacionales del Codex Alimentarius por el acuerdo de medidas sanitarias y fitosanitarias de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Guerrero y col, 2009).

#### **2.2.4.5. Legislación sanitaria**

Los posibles efectos tóxicos de los residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas en la leche y derivados han llevado a las autoridades sanitarias de los países a establecer, límites máximos de estos residuos (LMR) para poder garantizar la inocuidad de este importante alimento. A nivel internacional la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), han formado un programa conjunto a través del Codex Alimentarius, para establecer y recomendar los LMR de medicamentos de uso veterinario y plaguicidas en leche. Cada país implanta sus propias regulaciones al respecto; se ha observado que en países donde se tienen programas periódicos de seguimiento de residuos en leche se ha logrado disminuir su incidencia (Honkanen y Reybroek, 1997).



En nuestro país la normativa sobre los residuos veterinarios en alimentos de consumo humano está tipificada en el Reglamento Tecnológico de Carnes (D.S. N° 22-95-AG), el cual en el Título III, artículo 19, establece que, está prohibido beneficiar con fines de comercialización todo animal que se encuentre en tratamiento hasta que los residuos hayan sido eliminados o metabolizados.

En lo que respecta a Leche, no existe ninguna normativa vigente, el INDECOPI establece criterios y requisitos de leche cruda, sin embargo, la Norma Técnica peruana, no tiene ninguna especificación exacta sobre la presencia de residuos de antibióticos en leche cruda, el único requisito en el que podría estar involucrado este aspecto se encuentra en la frase “la leche debe estar exenta de sustancias extrañas”, en contraparte este punto si es contemplado y especificado en otras normas internacionales, como el Codex Alimentarius (INDECOPI, 2003).

#### **2.2.4.6. Riesgos de la presencia de antibióticos para la salud pública.**

Cuando se consume alimentos provenientes de animales que fueron tratados con estos productos, en los cuales no se respetó el periodo residual antes de la faena, en la sangre y el cuerpo de los animales, las personas pueden ser intoxicadas. (SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL, 2010). Es importante señalar asimismo que pueden alterar la micro flora intestinal humana y contribuir al aumento de la resistencia de bacterias a antibióticos, tema de gran actualidad (OMS, 2002).



### 2.2.5 Métodos para detectar residuos de antibióticos

Los primeros métodos para la detección de residuos de antibióticos en la leche empezaron a utilizarse alrededor de los años 50 (Bishop y White, 1984) y se basaban principalmente en pruebas de inhibición microbiana. Desde entonces, se han mejorado ostensiblemente muchas de las características de estos métodos como la rapidez de respuesta, exactitud, sencillez y sensibilidad, al tiempo que se han desarrollado numerosos métodos basados en técnicas inmunológicas o de receptores proteicos/microbianos que han reducido considerablemente los tiempos de ensayo a escasos minutos. Además, las últimas tecnologías, han integrado las técnicas inmunoenzimáticas con las aplicaciones electrónicas dando como resultado métodos basados en biosensores de alta especificidad y sensibilidad, que ofrecen un futuro prometedor dentro del campo de la detección de residuos en alimentos.

Los métodos microbiológicos de cribado están basados fundamentalmente en pruebas de inhibición del crecimiento microbiano, 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 para producir ácido, reducir colorantes o producir halos de inhibición en un medio de cultivo, de manera que el resultado se puede interpretar visualmente. El BRT<sup>®</sup>, Delvotest<sup>®</sup> o Eclipse<sup>®</sup>, son algunos de los métodos más utilizados en la actualidad y todos ellos emplean el *Geobacillus steraothermophilus* var. *calidolactis* como microorganismo de prueba (Bishop y White, 1984).



Según el *Codex Alimentarius*, los métodos se pueden clasificar según la información y detalles analíticos facilitados con respecto a la cuantía y al carácter del analito o analitos de interés (Pérez, 2005).

Tipo I: Cuantifican el volumen de un analito específico o una clase de analitos e identifican positivamente el analito, por lo que ofrece el mayor grado de fiabilidad en lo que respecta a la cuantificación e identificación de la estructura del analito en el tipo de interés. Estos métodos pueden constituir un procedimiento único por el que se determinan tanto la concentración como la identidad del analito o ser una combinación de métodos para cuantificar y confirmar la estructura del residuo de un medicamento veterinario. Por ejemplo: Técnica Cromatográfica Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Tipo II: Determinan la concentración de un analito en el tipo de interés, pero no permiten una identificación inequívoca de la estructura. Estos métodos pueden emplearse también para verificar la presencia de un compuesto o clase de compuestos. Dos métodos de éste tipo pueden facilitar información oportuna para un método del Tipo I cuando aplican procedimientos químicos diferentes.

Tipo III: Proporcionan una información menos definitiva pero útil, estos procedimientos de ensayo determinan por lo general la presencia o ausencia de un compuesto o clase de compuestos en un tipo de interés especificado. Con frecuencia se basan en técnicas no instrumentales, en esta categoría se incluyen muchos de los procedimientos microbiológicos de ensayo con placas de agar, ensayos de inhibición de enzimas y sistemas basados en la inmunología. Son útiles en los programas de control de residuos debido a su gran capacidad muestral, su





comodidad y su posible adecuación en los distintos laboratorios. Por ejemplo: Kit snap.

En la valoración de residuos de antibióticos en los alimentos se emplean preferentemente métodos microbiológicos, cuyo fundamento es la sensibilidad de ciertos microorganismos para los diversos antibióticos aplicados a distintas técnicas, que se basan en la respuesta, positiva, negativa o graduada. Estos métodos pueden demandar unos minutos, horas o hasta una noche entera de inoculación, en el caso de los más comunes; también los hay por dilución en medio sólido o medio líquido, usando diferentes métodos para determinar el efecto. Existen también análisis donde se utilizan kits, basados en técnicas inmucromatográficas, para realizar determinaciones rápidas de presencia o no de antibióticos principalmente en alimentos como leche y carnes (Cravzovet *al*,2002).

Los ensayos de inhibición microbiológica se basan en el crecimiento de un microorganismo (normalmente *Bacillus stearothermophilus*) que origina una reacción coloreada consecuencia del ácido que produce durante una incubación de 2 – 3 horas. Estos análisis detectan la presencia de cualquier compuesto que inhibe el crecimiento de microorganismo y, por lo tanto, impide el cambio de color, pero son especialmente sensibles a los compuestos B-lactámicos. El test de inhibición microbiológica más utilizado es el “Delvotest P” (Early, 2000).

### **2.2.6 Principales métodos microbiológicos comerciales**

Actualmente, las pruebas microbiológicas comerciales aplicadas con mayor frecuencia en la detección de antibióticos en la leche utilizan *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* como microorganismo de prueba, ya que se trata de una bacteria-test muy sensible a los antibióticos betalactámicos que se



emplean ampliamente para el tratamiento de las mastitis. Por ello, los métodos BRT® AiM (Analytic in MilkProductions-undVertriebs-GmbH, Alemania), Delvotest (DSM FoodSpecialties, Delf, Holanda), Charm® Blue Yellow (CharmSciencesInc, Massachussets, USA) y Eclipse® (ZEU-Inmunotec S.A. Zaragoza, España) representan actualmente los principales métodos microbiológicos más comúnmente utilizados, con características que presentan diferencias entre ellos. Además, estos métodos poseen la capacidad de detectar niveles cercanos a sus respectivos LMR para un gran número de sustancias que pertenecen a este grupo de antimicrobianos. Ahora bien, estos métodos no llegan a detectar antibióticos pertenecientes a todos los grupos o familias de antibióticos como quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos y macrólidos (Le Breton et al, 2007).

### **2.2.7 Sistemas microbiológicos multiplacas para la detección y clasificación de antibióticos en la leche.**

Los Sistemas Microbiológicos Multiplaca (SMMP) fueron propuestos para la detección y posterior clasificación de los antibióticos en grupos de antibióticos utilizando diferentes bacterias-test específicas para cada familia, tales como, betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas, aminoglucósidos, macrólidos o quinolonas.

El principio de los SMMP se basa en la difusión de los antimicrobianos contenidos en la muestra de leche a un medio agarizado con diferentes microorganismos de prueba, medios de cultivo, condiciones de pH, temperatura de incubación y tiempo de lectura. Actualmente, según el formato donde se lleva a cabo la difusión de los antibióticos, los sistemas microbiológicos se clasifican en Sistemas Microbiológicos en Placas de Petri (SMMP: difusión radial) y Sistemas



Microbiológicos en microplacas de microtitulación (SMpm: difusión axial en microtubo).

- Sistemas microbiológicos en placas de microtitulación

Los sistemas microbiológicos en placas de microtitulación (SMpm) presentan ciertas ventajas con respecto al SMMP, tales como, análisis de un elevado número de muestras, uso de bacterias esporuladas (prolongación del periodo de almacenamiento refrigerado), no necesita personal calificado para la elaboración de los métodos, presentan tiempos de incubación reducidos (2,5 - 6 horas) y la respuesta es de tipo dicotómica positivo (presencia) – negativo (ausencia).

Cada bioensayo está compuesto por un medio de cultivo agarizado que contiene esporas de una bacteria-test específica para detectar un determinado grupo de antibiótico, sustancias mejoradoras de la sensibilidad (trimetoprim, cloranfenicol, etc.) e indicadores de pH (o redox), de manera que el resultado se pueda interpretar visualmente mediante el cambio en la coloración del ensayo. Luego que se adiciona una muestra de leche en el pocillo del bioensayo, se incuba en a una temperatura–tiempo determinada por el tipo de bacteria-test. En caso que la muestra esté libre de antibiótico, se producirá el desarrollo del microorganismo acompañado de un cambio en la coloración del indicador ácido-base (o redox), mientras que la presencia de antibióticos en la leche no permitirá el desarrollo del microorganismo de prueba y por lo tanto se conservará el color inicial del indicador. Nagel *et al.* (2011) proponen un sistema microbiológico conformado por dos bioensayos (BT y BS) que contienen esporas de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*, medios de cultivo (Agar de Recuento en Placa y Mueller Hinton),



sustancias mejoradoras de sensibilidad e indicadores (Púrpura de bromocresol y Negro Brillante-azul de Toluidina).

## 2.2.8 Valoración de pruebas diagnósticas

### Sensibilidad

La sensibilidad es la probabilidad de que la prueba dé positiva si la condición de estudio está presente (paciente enfermo o con patrón de referencia positivo). También se puede definir como la proporción de verdaderos positivos respecto al total de enfermos (Ochoa, 1999).

Es la proporción de verdaderos positivos identificados por la prueba del total de muestras con antibióticos (Pita &Pértegas, 2003).

$$SENSIBILIDAD = \left( \frac{VP}{VP + FN} \right)$$

VP: verdaderos positivos

FN: falsos negativos

### Especificidad

La especificidad es la probabilidad de que la prueba dé negativa si la enfermedad está ausente (paciente sano o con patrón de referencia negativo). También se puede definir como la proporción de verdaderos negativos respecto al total de sujetos sanos (Ochoa, 1999).

Es la proporción de verdaderos negativos identificados por la prueba del total de muestras con ausencia de antibióticos (Pita &Pértegas, 2003).

$$ESPECIFICIDAD = \left( \frac{VN}{VN + FP} \right)$$

VN: verdaderos negativos.

FP: falsos positivos.



## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ubicación

El estudio se realizó en el laboratorio de microbiología de la escuela profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, ubicado en la ciudad de Puno que se encuentra ubicada a 3827 msnm, el clima de Puno es frío, la media anual de temperatura máxima y mínima 14.4°C y 2.7°C respectivamente (SENAMHI, 2011).

Las muestras de leche fueron recolectadas de los diferentes mercados locales de la ciudad de Puno: Central, Laykakota, Bellavista y Jr los Incas.

Para la ejecución del presente trabajo se recolecto un total de 48 muestras de leche cruda, proveniente de expendedoras que venden la leche en la vía pública y mercados.

#### 3.2 Material experimental

##### 3.2.1 Tamaño de muestra

La cantidad de muestras a analizar, se obtuvo mediante la fórmula descrita por Wayne, (1999).

$$n = (Z^2 * p * q) / e^2$$

n = tamaño de muestra (54)

Z = nivel de confianza (95%)

e = precisión (error máximo admisible en términos de proporción) (5%)

p = probabilidad (83%) resultados obtenidos por otros investigadores.

q = probabilidad de fracaso (5%)



$$n=1,962*0,17*0.83/0,1^2$$

$$n=54$$

Tamaño de muestra corregida.

$$N= n/(1+(n-1) /450).$$

$$N= 48.$$

El total de muestras a analizar fue de 48.

### 3.2.2 Materiales y reactivos de laboratorio

- Tubos de ensayo de 10 mL.
- Micropipeta.
- Placas de micropozos
- Canastillas.
- Jeringas.
- Asa de Kolle.
- Antibióticos comerciales (penicilina, tilosina, oxitetraciclina).
- Medios de cultivo Caldo soya triptona
- Púrpura de bromocresol

### 3.2.3 Equipos

- Autoclave
- Estufa
- Incubadora
- Refrigeradora
- Microscopio

### 3.2.4 Cultivos

- Cultivos de *Bacillus subtilis*



- Cultivos de *Streptococcus thermophilus*
- Cultivos de *Lactobacillus bulgaricus*

### 3.3 Metodología

El método empleado es el experimental, el cual consiste en la realización de experimentos en laboratorio, obteniendo resultados a través de factores como la observación, control y medición.

Para el estudio se ha utilizado bacterias que pertenecen normalmente a la carga microbiológica de la leche y del yogurt, las cuales fueron identificadas y aisladas en experimentos anteriores.

Para la realización del experimento se utilizó leche deshidratada para el cultivo de bacterias, la cual fue restablecida de acuerdo a la prescripción del fabricante que es de 24g en 200mL de agua. El indicador orgánico colorimétrico elegido fue púrpura de bromocresol al 0.1%.

Los antibióticos utilizados fueron penicilina, oxitetraciclina y tilosina, los cuales son de primera elección frente a enfermedades en un establo lechero.

Utilizando la bacteria más sensible a los antimicrobianos se determinó la presencia de antimicrobianos en leche bovina expendida en la ciudad de Puno.

#### **3.3.1 Procedimiento para determinar la bacteria más sensible a los antimicrobianos más utilizados en ganadería.**

- Para ello se colocó 1 mL de leche deshidratada diluida (reconstituida según la prescripción del fabricante) en 27 tubos controles (nueve repeticiones para cada bacteria) y en 27 tubos (tres repeticiones para cada bacteria y para cada antibiótico) previamente esterilizados, seguidamente



se agregó 0.7 mL de púrpura de bromocresol diluido al 0,1%, para finalmente en dicha solución, cultivar 0.4 mL de una suspensión de bacterias a una concentración 0,5 Mac Farland (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Bacillus subtilis*). A estos cultivos se agregó los antibióticos Penicilina, oxitetraciclina y Tilosina, a una concentración mayor de los LMR (0.032 ug para penicilina, 0.80ug para tilosina y 0.80 ug para oxitetraciclina) realizando las diluciones de penicilina, tilosina y oxitetraciclina en agua destilada, mientras que a los tubos controles se omitió colocar antibióticos Todos los tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas y se identificó la bacteria más sensible.

- Tras el periodo de incubación se hizo la lectura de los tubos de ensayo para observar el cambio de color de cada uno. Las muestras negativas (control) a presencia de antibiótico tenían una coloración distinta a la inicial, lo que indica el crecimiento de las bacterias, por lo que hay un cambio al pH de la muestra. Y en caso de las muestras con antibióticos mantienen la coloración púrpura, al no haber desarrollo de microorganismos por lo tanto no hubo un cambio de pH (acidificación del medio).

### **3.3.2 Procedimiento para determinar la concentración inhibitoria mínima de tres antibióticos de la bacteria sensible.**

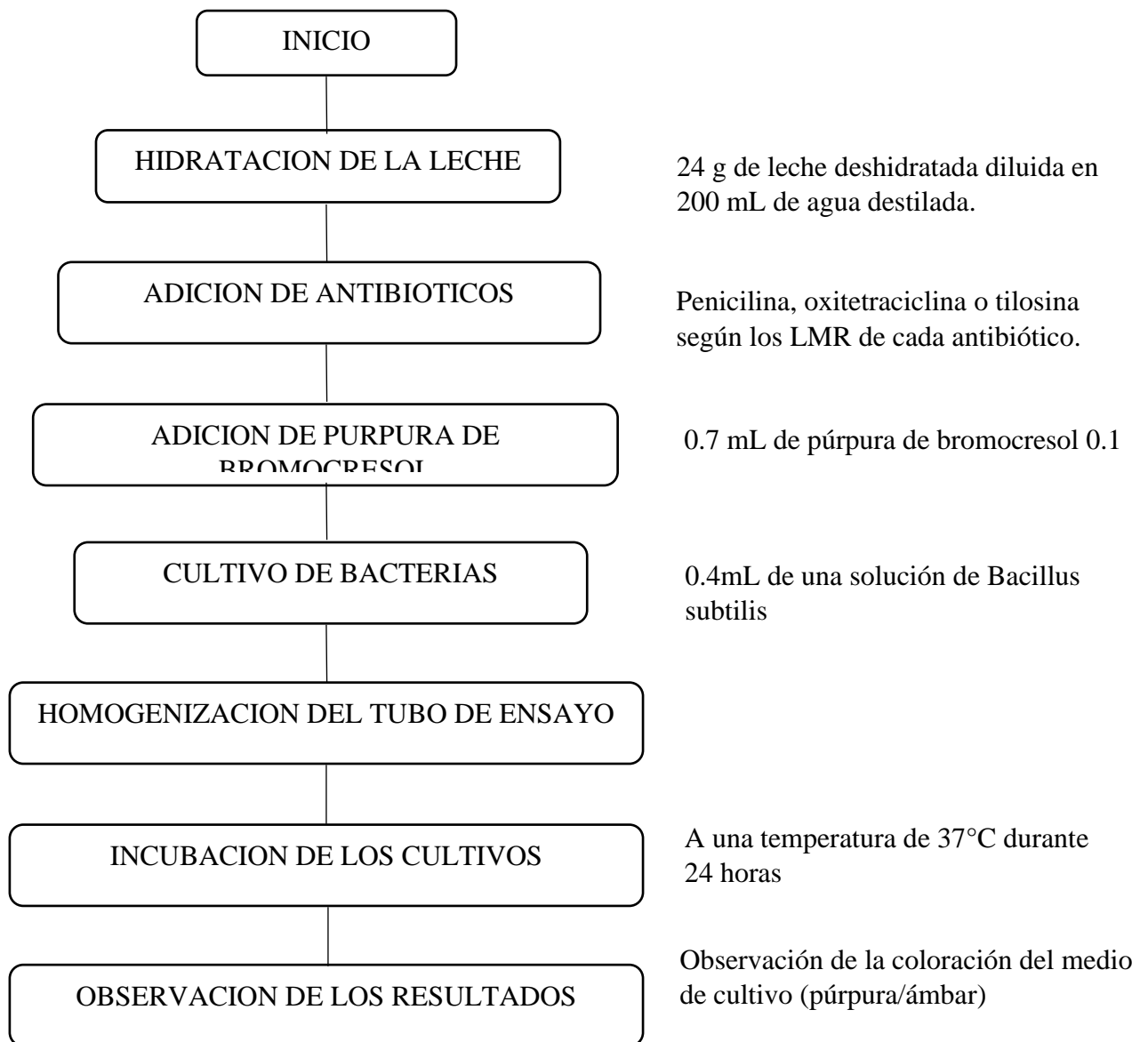
El procedimiento para detectar la CIM se realizó mediante el cultivo de *Bacillus subtilis* (que resultó ser la bacteria más sensible a los antibióticos en estudio) en leche con púrpura de bromocresol como sustancia indicadora, agregándose una cierta cantidad de antibiótico de acuerdo a LMR de cada antibiótico.





Se cultivó *Bacillus subtilis*, al cual se le agregó diferentes concentraciones de antibiótico, desde los LMR hasta concentraciones mayores como se detalla a continuación:

- Se preparó el medio de cultivo, el cual fue 250 ml de leche en vasos de precipitación.
- Se inoculó los antibióticos por separado (penicilina, tilosina y oxitetraciclina) en concentraciones desde los LMR, 2\*LMR, 4\*LMR, 8\*LMR, y uno control sin antibióticos.
- De cada muestra de antibiótico y concentración se separaron 10 mL, los cuales fueron colocados en tubos de ensayo.
- A cada tubo se añadió 7mL de púrpura de bromocresol.
- A cada tubo se añadió 0.4 mL de un cultivo de *Bacillus subtilis* de una suspensión 0.5 Mac Farland.
- Se incubaron dichos tubos a 37°C durante 24 horas.
- Tras 24 H de incubación se observó los resultados.



*Figura 1* Diagrama para la determinación de la concentración inhibitoria mínima de tres antibióticos de la bacteria sensible.

### 3.3.3 Procedimiento para determinar la sensibilidad y especificidad del método microbiológico propuesto.

#### 3.3.3.1 Determinación de la sensibilidad

Para determinar la sensibilidad de la prueba, se utilizaron 30 muestras de leche deshidratada diluida, dispuestas 50 uL en micro pozos



(10 muestras para cada antibiótico con 3 repeticiones para cada antibiótico), con 0,7 uL de púrpura de Bromocresol al 0,1%, se adicionó 50 uL de cultivo de *Bacillus subtilis*, a cada muestra se añadió concentraciones de antibióticos iguales a su respectivo LMR, que inhibieron el desarrollo bacteriano y se observaron con el cambio o no del color del púrpura de bromocresol y con los resultados se obtuvo la sensibilidad, utilizando la fórmula siguiente: (Pita &Pértegas, 2003).

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN}$$

### 3.3.3.2 Determinación de la especificidad

Las muestras de leche para la especificidad se preparó leche deshidratada diluida, que según las indicaciones del producto no presenta residuos de antibióticos y se dispusieron en 30 micro pozos.

Las 30 muestras de leche dispuestas 50 uL en cada micro pozo, se adicionó 0,7 uL de púrpura de bromocresol al 0.1%, y 50 uL de cultivo de *Bacillus subtilis*, para después incubarlo a 37 °C por 24 horas, para observar el cambio o no de coloración y con los resultados se obtuvo la especificidad utilizando la siguiente fórmula: (Pita &Pértegas, 2003).

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP}$$

### 3.3.3.3 Determinación del valor predictivo positivo y negativo

Para determinar dichos valores, se usaron los resultados obtenidos en sensibilidad y especificidad, utilizando las siguientes fórmulas: (Pita & Pértegas 2003)



$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

Donde:

VPP: valor predictivo positivo

VPN: valor predictivo negativo

VP: verdaderos positivos

VN: verdaderos negativos

FN: falsos negativos

VN: verdaderos negativos

### **3.3.4 Procedimiento para determinar la presencia de residuos de antibióticos en leche expendida.**

Las muestras se recolectaron de los principales mercados de la ciudad de Puno (Mercado Central, Jr Los Incas, Mercado Laykakota y Mercado Bellavista).

Se recolectaron 48 muestras en total, de 20 mL aproximadamente para ello se utilizó bolsas estériles de polipropileno desechables, luego fueron llevadas al laboratorio para su análisis respectivo.

Utilizando la prueba bacteriológica propuesta, se preparó una placa de micro pozos en los que se agregó 50 uL de cada muestra de leche en un micro pozo adicionando 0,7 uL púrpura de bromocresol al 0,1 % como sustancia indicadora y luego se agregó 50 uL de un cultivo de *Bacillus subtilis* en caldo Tripticasa soya a la concentración de 0.5 MacFarland, luego se incubó a 37° C por 24 horas, determinándose así la presencia o no de residuos de antibióticos en leche fresca expendida en la ciudad de Puno.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Determinación de la bacteria más sensible a los antibióticos más utilizados en ganadería.

Para determinar la bacteria más sensible a los antibióticos más utilizados en ganadería, se enfrentó los LMR de antibióticos a las tres bacterias en estudio, los resultados mostramos a continuación:

Tabla 5 Bacteria más sensible a los antibióticos más utilizados en ganadería.

Bacteria	Penicilina		Tilosina		Oxitetraciclina		Total	
	Negativo (control)	positivo	Negativo (control)	positivo	Negativo (control)	positivo	Negativo (control)	positivo
<i>B. subtilis</i>	3	3	3	3	3	3	9	9
<i>L. bulgaricus</i>	3	3	4	2	4	2	11	7
<i>S. thermophilus</i>	3	3	4	2	3	3	10	8

La proliferación de las bacterias ácido lácticas incrementan el pH del medio, la presencia de antibióticos inhibirá dicho crecimiento de acuerdo a la sensibilidad de las bacterias a dichos antibióticos, de acuerdo con ello se interpretan los resultados obtenidos. Mientras que en un cultivo con crecimiento bacteriano cambiará el color de púrpura a ámbar por la acidificación del medio (resultado negativo); en un cultivo con inhibición bacteriana el indicador colorimétrico se mantendrá en purpura (resultado positivo). De la Tabla 5 se deduce que la bacteria con mayor respuesta colorimétrica por lo tanto el más sensible a los antibióticos más utilizados en ganadería, es el *Bacillus subtilis* por ser la bacteria con mayor respuesta colorimétrica en comparación con las otras dos bacterias.

Un estudio similar realizado en Puno (Ticona, 2017), compara a estas tres bacterias para identificar a la bacteria más sensible usando métodos cuantitativos como la medición del halo inhibitorio, dando resultados muy similares a este trabajo, demostrando que el



*Bacillus subtilis* es mucho más sensible a comparación del *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, resultados similares encontrados en ambos estudios.

Diferentes estudios realizados para detectar la presencia de antibióticos en alimentos destinados al consumo humano usan métodos microbiológicos para ello, siendo el *Bacillus subtilis* una bacteria de elección al ser esta muy sensible a diferentes antibióticos.

Un bioensayo realizado en la ciudad de Colombia determinó la presencia de residuos de antibióticos (penicilina g, oxitetraciclinas, eritromicina y estreptomycinina) en carne bovina, para ello cultivo tres distintas bacterias *Kocuria rhizophila*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* para determinar su uso como prueba de detección cualitativa para el monitoreo de antibióticos en carne, obtuvieron resultados satisfactorios (Vela et al., 2014) En dicho bioensayo se puso a prueba a *Bacillus subtilis* para demostrar su sensibilidad frente a residuos de antibióticos en carne de res lo cual resultó de manera positiva, demostrando que dicha bacteria es sensible a antibióticos.

Dos estudios realizados en canales del departamento de Puno concuerdan con este estudio al definir al *Bacillus subtilis* como bacteria sensible frente a antibióticos, los cuales determinaron la presencia de residuos de antibióticos en canales de res, para lo cual realizaron la técnica difusión en placa, usando a dicha bacteria como indicadora, dichos trabajos tuvieron resultados positivos. (Paredes, 2018) ;(Aguilar, 2018).

#### 4.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de tres antibióticos de la bacteria sensible.

Tabla 6 Cultivo de *B. subtilis* a diferentes concentraciones de Penicilina

Cultivo de bacteria	Concentración de penicilina ug*/ml			
	0.004	0.008	0.016	0.032
<i>Bacillus subtilis</i>	positivo	positivo	positivo	positivo
Control	negativo	negativo	negativo	negativo

\*1ug equivale a 1000000 UI de penicilina procaínica (Sumano& Ocampo, 2006).

Tabla 7 Cultivo de *B. subtilis* a diferentes concentraciones de Oxitetraciclina

Cultivo de bacteria	Concentración de oxitetraciclina ug/ml			
	0.1	0.2	0.4	0.8
<i>Bacillus subtilis</i>	positivo	positivo	positivo	positivo
Control	negativo	negativo	negativo	negativo

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8 Cultivo de *B. subtilis* a diferentes concentraciones de Tilosina

Cultivo de bacteria	Concentración de tilosina ug/ml			
	0.05	0.1	0.2	0.4
<i>Bacillus subtilis</i>	positivo	positivo	positivo	positivo
Control	negativo	negativo	Negativo	negativo

Fuente: Elaboración propia

Se determinó que el *Bacillus subtilis* es sensible a antimicrobianos como penicilina, tetraciclina (oxitetraciclina) y macrólidos (tilosina), al no existir proliferación de esta bacteria en presencia de estos fármacos, incluso a concentraciones iguales a los LMR de cada antibiótico.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo hallado por Vela et al (2014) quienes determinaron que cultivos de bacterias (*Kocuria rhizophila*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* var. *mycoides*) son sensibles a diferentes antibióticos (oxitetraciclina,

penicilina potásica, estreptomycin y eritromicina) incluso a valores iguales a sus respectivos LMR para cada antibiótico.

Este estudio tiene relación con un estudio realizado en la ciudad de Lima, en el cual se determinó la presencia de antibióticos en tejido muscular de pollo, para lo cual también utilizaron como bacteria sensible al *Bacillus subtilis*, en dicho trabajo obtuvieron resultados positivos en la presencia de antibióticos (Azañero & Chiroque, 2010).

Un estudio realizado en Chile, obtiene resultados similares a nuestro estudio, en el cual se determinó la presencia de antibióticos en carne de reses, para ello también usaron *Bacillus subtilis* como bacteria indicadora (Gesche, 1998).

#### 4.3. Determinación de la especificidad, sensibilidad y valor predictivo positivo y negativo del método biológico.

##### 1. Determinación de la sensibilidad.

Tabla 9. Determinación de la sensibilidad del método biológico.

Detección de residuos de Bacteria antibióticos	Sensibilidad (%) LMR								
	Penicilina 0.004ug/mL			Oxitetraciclina 0.10 ug/MI			Tilosina 0.05 ug/mL		
	Total	Positivo	%	Total	Positivo	%	Total	Positivo	%
Inhibición en leche <i>B. subtilis</i>	30	30	100	30	29	96.7	30	28	93.3

Se determinó una alta sensibilidad en el estudio realizado, llegando a valores del 100% en sensibilidad a penicilinas, de la misma manera un estudio realizado en la ciudad de Puno demuestra valores de sensibilidad mayores a un 90 % (93.75%-100%) dichos valores se obtuvieron exponiendo a bacterias sensibles, entre ellas al *Bacillus subtilis* a antimicrobianos como penicilina, oxitetraciclinas y tilosina (Ticona, 2017) esto nos indica la alta sensibilidad de la bacteria frente a dichos antimicrobianos.



Los valores encontrados para la sensibilidad son altos, los resultados son similares a los hallados por Mc Grane et al. (1996) quien determinó una sensibilidad del 98% para la cloxacilina, resultado similar encontrado en este estudio, ello indicaría la alta sensibilidad de los métodos microbiológicos hacia betalactámicos.

## 2. Determinación de la especificidad.

Tabla 10. Determinación de la especificidad del método biológico.

Detección de residuos de antibióticos	Bacteria	Total de muestras	Especificidad (%)			
			Negativos	Dudosos	Positivos	%
Inhibición en leche	<i>B. subtilis</i>	30	29	1	0	96.7

La leche contiene inhibidores naturales, los cuales podrían darnos resultados como dudosos ya que estos inhiben de manera natural el crecimiento bacteriano. Para disminuir ello, se considera que la leche a analizar se debe de calentar a 82°C durante 10 minutos, lo cual reduce el porcentaje de resultados positivos hasta un 0.9% (Yamaki & col. 2011).

Un estudio realizado en Lima sobre la actividad antimicrobiana residual en urocultivos, usando tres cepas indicadoras (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) determinó una especificidad del 100 % para cada cepa bacteriana obteniendo así valores similares a este estudio.

Un bioensayo similar realizado en la ciudad de Colombia, en la detección de antimicrobianos en la carne bovina, determinó una especificidad del 100%, para ello



se cultivaron 3 bacterias, entre ellas al *Bacillus subtilis*, dichos resultados muestran similar especificidad con este trabajo.

### 3. Determinación del valor predictivo positivo y negativo.

De los cuadros 11 y 12 se obtiene los siguientes valores:

- Verdaderos positivos (VP) 87
- Falsos positivos (FP) 3
- Verdaderos negativos (VN) 29
- Falsos negativos (FN) 1

Con dichos valores determinamos que el valor predictivo positivo es 96.67 %, y el valor predictivo negativo es 96.67%. El valor predictivo positivo indica que, si una muestra de leche con esta prueba, el resultado sale positivo, dicho resultado tiene un 96.67% de que tenga antibiótico, mientras que el valor predictivo negativo indica que, si una muestra de leche analizada con esta prueba sale negativa, dicho resultado tiene un 96.67% de que no tenga antibiótico.

#### 4.4. Determinación de antibióticos en leche expendida en los mercados de la ciudad de Puno

Tabla 11 Determinación de la presencia de residuos de antibióticos en leche expendida en los mercados de la ciudad de Puno

Detección de residuos antibióticos	Total de muestras analizadas	Positivos		Dudosos		Negativos	
		Total	%	Total	%	Total	%
Mercado Bellavista	12	3	25	1	8.3	8	66.7
Mercado Central	12	2	16.7	0	0.0	10	83.3
Jirón Los Incas	12	2	16.7	1	8.3	9	75.0
Mercado Laykakota	12	1	8.3	0	0.0	11	91.7
<b>TOTAL</b>	<b>48</b>	<b>8</b>	<b>16.7</b>	<b>2</b>	<b>4.2</b>	<b>38</b>	<b>79.2</b>

De los resultados obtenidos, los datos como dudoso se consideraron como positivos. Siendo un 20.8 % el porcentaje de muestras positivas a presencia de residuos de antibióticos.

La tabla 11 nos indica que de las 48 muestras de leche recolectadas de los mercados de la ciudad de Puno un 20.8% resultaron positivas, y un 79.2% resultaron negativas. El presente estudio revela presencia de residuos de antibióticos en la leche expendida en la ciudad de Puno.

Los valores hallados en este estudio tienen mucha similitud a lo hallado por Huaranca, (2018.) quien determinó la presencia de residuos de antibióticos en la Provincia de Taraco, Departamento de Puno, quien encontró un 20% en leche fresca, un porcentaje similar al encontrado en este estudio, dicha investigación, se



realizó usando el kit comercial Desvotest® SP-NT, el cual es una prueba microbiológica que usa *Bacillus stearotherophilus* como bacteria indicadora. La presencia se debe a que los criadores no respetan el periodo de retiro del antibiótico destinando la leche al consumo humano, es probable que los criadores desconozcan sobre el tema de periodo de retiro de un antibiótico, y/o sobre las consecuencias en las personas que consumen dicha leche.

Un estudio similar realizado en la provincia del Callao (Guerrero & col, 2009) encontró un 40% de presencia de residuos de antibióticos en leche cruda comercializada lo cual es el doble de lo encontrado en este estudio, esto se debe tal vez a que dicho estudio fue realizado usando o el método presuntivo para antibióticos  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas de IDEX Laboratories, el cual cumple con los límites de sensibilidad de residuos de la FDA. Esta prueba al tener normativa internacional, está obligada a cumplir ciertos parámetros, comparándola a nuestra prueba la cual no lo tiene, pudiendo existir errores al momento de indicar una prueba positiva como negativa. Otra causa por el alto nivel de residuos de antibióticos encontrados en dicho estudio, puede ser la adulteración en su integridad con leches contaminadas, o con sustancias inhibidoras, ya que dichas muestras fueron colectadas directamente de los contenedores de los vendedores.

Igualmente, un estudio realizado en la ciudad de Cajamarca (Llanos 2002) encuentra presencia de antibióticos (20.83%) en leche fresca expendida a la población cajamarquina, dichas muestras fueron obtenidas de mercados y de fundos. Estos resultados son similares a los hallados en este estudio, ello se debe probablemente como ya se mencionó a que los pobladores no conocen sobre el



periodo de retiro de un antibiótico, o a la falta de asistencia veterinaria que indique sobre los riesgos que conlleva al vender dicha leche.

Diferentes estudios realizados en Latinoamérica, indican resultados positivos a la presencia de antibióticos en leche cruda comercializada; en México, Noa-Lima et al.(2009) encontraron un 9.8% de 264 muestras a la presencia de antibióticos; igualmente Camacho et al.(2010) encontraron un 18.6% de 129 muestras recogidas de diferentes lugares de venta de leche fresca, pero el porcentaje más elevado lo manifiestan Ramírez et al.(2001) que encontraron niveles mayores a 50%, dicho estudio se realizó usando la técnica de HPCL, la cual es más sensible comparándola con métodos microbiológicos, tal vez sea por el uso de dicha técnica que los niveles aumentaron considerablemente; en Ecuador, Álvarez y Aroca(2016) analizaron 72 muestras de leche cruda recogida de expendios comerciales, de las cuales 14 muestras fueron positivas (19.4%), de Colombia (Vásquez & Olivera, 2012). Todos estos valores son cercanos al valor encontrado en este estudio.

La presencia de inhibidores en leche es responsabilidad del ganadero. Es probable que estos proveedores entreguen leches con antibióticos como consecuencia de un mal manejo en la finca. Entre las principales causas de residuos de antibióticos están el no respetar los tiempos de retiro de los medicamentos, ordeño de vacas que han presentado aborto o con períodos secos muy cortos, uso de medicamentos no aprobados, carencia de registros de medicación, sobredosificación de medicamentos, aplicación de medicamentos sin recomendación del Médico Veterinario, administración por vías no recomendadas, por los laboratorios fabricantes, residuos de soluciones



desinfectantes en el equipo de ordeño, mezcla con leches contaminadas, descarte de leche solamente del cuarto mamario tratado con antibiótico.(Calderón, 2008)



## V. CONCLUSIONES

- El método microbiológico propuesto con sustancia indicadora púrpura de bromocresol, puede detectar de manera cualitativa residuos de antibióticos en leche bovina a igual o a mayor concentración de los LMR, tiene una sensibilidad alta (93.3% para tilosina, 96.7% para oxitetraciclina y 100% para penicilinas), y una especificidad del 96.7% con valor predictivo positivo de 96.7% y valor predictivo negativo de 96.7%, siendo el *Bacillus subtilis* la bacteria indicadora de estos resultados.
- Utilizando el método microbiológico, se detectó residuos de antibióticos en leche expendida en la ciudad de Puno (20.9%)



## VI. RECOMENDACIONES

- Proseguir con estudios similares, buscando alternativas accesibles para la detección de antibióticos en alimentos de origen animal como la leche.
- Hacer comercial, alternativas como este estudio los cuales debería de ser baratos y accesibles para los productores y vendedores de leche.
- Cambiar la normativa peruana, especificando la cantidad de antibiótico permisible en la leche fresca, al igual que la divulgación y control de la misma en todas las zonas ganaderas.
- Concientizar primeramente a los consumidores y luego a los productores sobre el uso de medicamentos en vacas en producción al igual que el consumo de esta leche.





## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila, T.; Gutiérrez, C. 2001.** III Congreso Nacional de control de la mastitis y calidad de leche del 21 al 23 de junio. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria.
- Alpízar, Y. (2000).** La penicilina y sus derivados como agentes desencadenantes de la respuesta inmune. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 16, 99–104.
- Aguilar J. 2018** Residuos de antibióticos en canales de bovinos (*Bos taurus*) faenados en el camal municipal de la provincia de Ilave - Puno
- Aroca Rivera N. E. (2016)** Detección cualitativa de residuos de antibióticos en leche cruda comercializada en el cantón Naranjal provincia del Guayas (Trabajo de titulación). UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Machala, Ecuador.
- Azañero, M. &Chiroque, M. (2010)** Detección y cuantificación de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima Cercado (tesis de pre grado) Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Badui, D. S. 2006.** Química de los alimentos. Cuarta edición. México: PEARSON EDUCACIÓN.
- Bermudez, P.E.; Ascencios, P.M.; Cordoba, R.J.; Nuñez, B. y Rodríguez, M.J.2006.** Investigación de residuos de antibióticos. Prácticas de higiene, inspección y control alimentario, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, España.
- Blood, D. y Henderson, J., Radostis, O. 1986.** Medicina Veterinaria Quinta Edición. Editorial Interamericana, México.



- BOTANA, L.M.; LANDONI, M.F. & MARTIN-JIMENEZ, T. 2002.** Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Mc. Graw-Hill.
- Briones, P. G. (2005).** Detección de residuos de antimicrobianos, en leche bovina procesada, mediante Métodos de “SCREENING”. Universidad de Chile.
- Cabrera, M. y col. 2003.** Cómo obtener leche de buena calidad. Obtenido en la Red Mundial en 27/11/2017
- Camacho Díaz, L., & Cipriano Salazar, M., & Cruz Lagunas, B., & Gutiérrez Segura, I., & Hernández Ruiz, P., & Peñaloza Cortez, I., & Nambo Martínez, O. (2010).** Residuos de antibióticos en leche cruda comercializada en la región Tierra Caliente, de Guerrero, México. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 11 (2), 1-11.
- Calderón, A., Jimenez, G., & Garcia, F. (2008)** Determinación de buenas prácticas de ordeño en un grupo de gestión empresarial de ganaderos del altiplano cundiboyacense
- Cameán, M.A., & Reppeto, M. (2006).** Toxicología alimentaria. España: Diaz de Santos.
- Cárdenas, D. M., & Asencios, D. G. (2008).** *Evaluación de un método de ensayo microbiológico para determinar la potencia antibiótica de tirosina.* Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Retrieved from [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1217/1/Cardenas\\_sd.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1217/1/Cardenas_sd.pdf)
- Condori, A. 2017.** Prevalencia y factores de riesgo de mastitis subclínica en vacunos Brown swiss del distrito de Umachiri (Tesis de pregrado) Universidad Nacional del Altiplano, Perú.



- Cotrino, V. y Gaviria, B. 2003.** Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en Explotaciones Ganaderas. Mastitis y Calidad de la Leche. Obtenido en la Red Mundial en 22/03/18. [www.fedegan.org.co/81manejoIntegrado.html-55k](http://www.fedegan.org.co/81manejoIntegrado.html-55k)
- Cotrino, V. 2001.** Residuos de antibióticos. En: Memorias de curso “Cómo producir leche de óptima calidad. Bogotá.
- Crazvov, L.A.; Avallone, M.C. y Dupertuis, I. P. 2002.** Detección instrumental de Antibióticos en alimentos. Cátedra de química Analítica Instrumental, Dpto de Química Facultad de Agroindustrias-UNNE, Chaco, Argentina.
- Denobile, M., & Nascimento, E. de S. (2004).** Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40, 209–218. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v40n2/10.pdf>
- Early, R. (2000).** *Tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
- Embid, A. 2000.** Resistencia de las bacterias a los antibióticos. *Revista de Medicinas Complementarias, Medicina Holística.*, 15. Retrieved from <http://amcmh.org/PagAMC/medicina/articulospdf/53ResistenciaBacterias.pdf>
- Errecalde, J. 2004.** Uso de Antimicrobianos en Animales de Consumo Incidencias del Desarrollo de Resistencias en salud Pública, FAO producción y Sanidad Animal, Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Roma.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization 2005.** Working principles for risk analysis for application in the framework of the Codex Alimentarius. Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual.



- Gatica P., Cristina, & Gesche R., Erika. 2007.** "Método de las 5 Placas" Para la Detección de Residuos de Antibacterianos en Leche. *Revista Científica*, 17(3), 231-238. Recuperado en 25 de julio de 2019, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592007000300004&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592007000300004&lng=es&tlng=es).
- González, I., Vega, J., & Castillo, R. 2002.** Estudio de la calidad físico-químico de la leche entera de vaca en un sistema silvopastoril, 1. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911238004>
- Gesche, E., & Emilfork, C. (1998).** Residuos de antimicrobianos en canales de vacas. *Archivos de medicina veterinaria*, 30(2), 137-143.
- Guerrero, D. y col. 2009.** Detección de residuos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas en leche cruda comercializada en el Callao. *Rev. Ciencia e Investigación* 2009; 12(2): 79-82 Fac. Farmacia y Bioquímica UNMSM.
- Honkanen, B.T. y Reybroeck, W. 1997.** Antimicrobials, in monograph on residues and contaminants in milk and milk products. IDF. Brussels, Belgium. Pp. 26-33.
- Huaranca, F. 2018.** Determinación cualitativa de residuos de antibióticos betalactámicos en leche fresca bovina, en la micro cuenca del distrito de Taraco.
- INDECOPI. 2003** Leche y Productos lácteos: Leche Cruda, requisitos. NTP 202.001.2003. Comisión de reglamentos técnicos y comerciales 4ta edición Lima Perú. Págs.: 09.
- Kantiani L., Farré M., Barcelo D. 2009.** Analytical methodologies for the detection of 614  $\beta$ -lactam antibiotics in milk and feed samples. *Trends Anal. Chem.* 28: 729-744.



- Kastenmayer P. 1995** Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. Depósito de Documentos de la FAO, Departamento de Agricultura.
- Llanos, G. 2002.** Determinación de residuos de antibióticos en la leche fresca que consume la población de Cajamarca.
- Le Breton MH, Savoy-Perroud MC, Diserens JM. 2007.** Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk. *Anal. Chim. Acta*, 586: 280-283.
- León, V. E. 2013.** *Validación del método artesanal propuesto por José Ducbach, para la detección de diferentes tipos de antibióticos en leche de fincas ganaderas de los cantones Cayambe y Pedro Moncayo.* Universidad Politécnica Salesiana. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/4062/6/UPS-YT00181.pdf>
- Manrique, M. 2003** Revista medicina de la producción, Año 2, N° 1. LAVETSUR. Arequipa.
- Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., & Tordecilla, G. 2009.** Detección de antibióticos en leches: un problema de salud pública. *Revista de Salud Pública*, 11, 579–590. Retrieved from <http://www.scielosp.org/pdf/rsap/v11n4/v11n4a09.pdf>
- Mcewen S.A. y W.B. McNab 1997.** Contaminantes no bióticos en alimentos de origen animal. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 16 (2), 684-693.
- Mc Grane P., Rowe M.T., Anger S. 1996.** Evaluation of Delvotest SP and Charm AIM-96 for the detection a range of antibiotics in milk. *Milchwissenschaft*, 51: 330-332.



- Nagel O. G., Molina M. P., Althaus, R. L. 2013.** Use of chemometric techniques to design a microbiological method for sulfamide detection in milk. *Czech Journal of Food Sciences*. 31 (6): 627 - 632.
- Noa-Lima, Elizabeth, Noa, M, González, Delia G, Landeros, Patricia, & Reyes, Waldina. 2009.** EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y QUIMIOTERAPÉUTICOS EN LECHE EN JALISCO, MÉXICO. *Revista de Salud Animal*, 31(1), 29-33. Recuperado en 30 de julio de 2019, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2009000100006&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2009000100006&lng=es&tlng=pt).
- NTP-ISO707. 1998.** *Leche y productos lácteos. Lineamientos para el muestreo*. Lima, Perú.
- NTP202.001. 2003.** *Leche y productos lácteos. Leche cruda. Requisitos*. Lima, Perú. Retrieved from <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/723.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. 2002.** Problemas de Salud Publica Relacionados con el uso de Antibióticos en los alimentos y Piensos.
- Paredes, G. 2018.** Determinación de residuos de antibióticos por el método microbiológico en canales de bovinos faenados en el camal particular de Azogueine de la ciudad de Puno.
- Parra, M. H. y col. 2003.** Los residuos de medicamentos en la leche, problemática y estrategia para su control. Manual técnico CORPOICA, Colombia.
- Pellegrino, M. S., Frola, I. D., Odierno, L. M., & Bogni, C. I. 2011.** Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. *Revista Electronica de Veterinaria*, 12, 1-14. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63622567006>



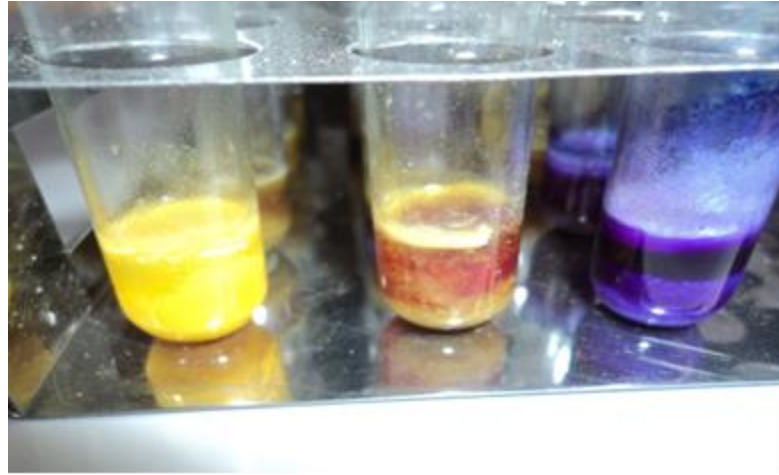
- Pikematt M. 2009.** Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Anal. Bioanal. Chem.*, 4: 1-14.
- Pita, S., &Pértegas, S. 2003.** Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y Especificidad. Retrieved from [http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas\\_diagnosticas/pruebas\\_diagnosticas.as](http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.as).
- Ramírez, Acacia, 2001.** "Detección de antibióticos en leche comercializada en la ciudad de México." *Revista de Salud Animal*, vol. 23, no. 1,
- Rodríguez, P.D. y Rodríguez, L.C. 1995.** Residuos de antibióticos en leche: determinación de cloramfenicol y estreptomicina. *Apuntes de Salud Pública. Asociación de alumnos y Master en Salud Pública, Instituto Gallego de Salud Pública Galicia. Abril (5) Págs: 15-16*
- Rodriguez, J. 2003.** Antibióticos, piensos legales y piensos ilegales.
- San Martín N., B., & Moraga, R. 1996.** Evaluación de la técnica microbiológica con *Bacillus Subtilis* BGA para la identificación de residuos de antimicrobianos en leche bovina. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 11(1). doi:10.5354/0719-5273.2010.4768
- Sánchez, G. 1997.** Residuos de fármacos antimicrobianos en alimentos de origen animal. Problemática general. *Revista ACOVEZ*, Vol. 20 N° 3. pp. 26 – 29.
- Scannella D., Neaves, P., Keedy K., Bell C. 1997.** An evaluation of the Delvo -X- Press  $\beta$ L test for detecting  $\beta$ -lactams in ex-farm raw milks. *Int. Dairy J.* 7: 93-96.
- Sumano, L. H., C. L. Ocampo, 2006.** *Farmacología Veterinaria*. Edit. Mc Graw – Hill interamericana. México.



- Suhren G., Heeschen W. 1994.** Proficiency study of microbial inhibitor test. *Milchwissenschaft*, 49: 629-633.
- Ticona, E., 2017.** Validación de una prueba biológica para detectar residuos de antibióticos en queso tipo paria (tesis de maestría). Universidad Nacional del Altiplano, Perú.
- Stead, S., Sharman, M., Tarbin, J., Gibson, E., Richmond, S., & Stark, J. 2004.** Meeting maximum residue limits an improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products.
- Vallejo, M. C. 1993.** Residualidad de los plaguicidas en los alimentos. Toxicología y seguridad de los alimentos. Primera edición. Fondo nacional universitario. Bogotá.
- Ortiz, C., Concha, A., & Cayro, J. 2011.** Recuento de células somáticas en leche contaminada con residuos de antibióticos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 22, 151–154.
- Vela, K. L., Tafur, M. A., Vela, M. P., & Suárez, M. C. 2014.** Evaluación preliminar del bioensayo para la detección de antimicrobianos en músculo bovino. *Vitae*, 21, 178–190.
- Yamaki, M., Berruga, M. I., Althaus, R. L., Molina, P., & Molina, A. 2011.** Screening of antibiotic residues in ewe milk destined to cheese by a commercial microbiological inhibition assay, (June 2016), 29.



## ANEXOS



**Figura1 Coloración del indicador orgánico.(Negativo-dudoso-positivo)**