

GUATEMALA, ABRIL DE 1994

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
**Biblioteca Central**

DL  
06  
T(1634)

JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANA	LICDA. CLEMENCIA DEL PILAR GALVEZ DE AVILA
SECRETARIO	LIC. JOSE FRANCISCO MONTERROSO SALINAS
VOCAL I	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
VOCAL II	LICDA. THELMA ESPERANZA ALVARADO DE GALLARDO
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. JORGE LUIS GALINDO AREVALO
VOCAL V	BR. EDGAR ANTONIO GARCIA DEL POZO

ACTO QUE DEDICO

- A DIOS: Por permitirme alcanzar esta meta.
- A MIS PADRES: Julio Alfonso Escalante  
Con inolvidable recuerdo  
María Elvira Bautista de Escalante
- A MI ESPOSO: Pedro Estuardo de León Auyón
- A MIS HIJOS: Pedro Alejandro y David Estuardo
- A MIS HERMANOS: Irma Judith y César
- A MIS SOBRINOS: Julio Daniel, Eliot Samuel y Estefani Judith

## A G R A D E C I M I E N T O S

A la Lic. Teresita Aguilar de Miranda, por su asesoría y consejos brindados para la elaboración de esta tesis.

A la Lic. Ericka Patricia Soto y Lic. María de los Angeles Monterroso, por sus valiosos consejos y amistad.

Al personal del Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos LUCAM, especialmente a:

Lic. Elsa de Reyes

Lic. Edna Judith Villatoro de Castro

Lic. Alba Aceituno

Lic. Silvia Echeverría

Lic. Inf. Maribel Robledo

Lic. Inf. Olga Aguilar

Sra. Thelma Ruiz

Sr. Antonio Muralles

Sr. Edelman González

## I N D I C E

		PAGINA
I.	Resumen.....	1
II.	Introducción.....	3
III.	Antecedentes.....	5
	A) Composición y Valor Nutritivo de la Leche.....	5
	B) Mastitis.....	8
	C) Antibióticos.....	10
	D) Detección de Residuos de Antibióticos.....	15
IV.	Justificaciones.....	20
V.	Objetivos.....	21
VI.	Hipotesis.....	22
VII.	Materiales y Métodos.....	23
VIII.	Resultados.....	34
IX.	Discusión de Resultados.....	35
X.	Conclusiones.....	37
XI.	Recomendaciones.....	38
XII.	Referencias.....	39
XIII.	Anexos.....	45

## I. RESUMEN

El propósito de este estudio fue determinar que el Método de Difusión en Agar utilizando discos de papel de media pulgada de diámetro y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 es un método microbiológico rápido, práctico y sencillo de ejecutar para un número grande de muestras por lo que puede ser establecido en el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM), como el método rutinario para la detección de residuos antibióticos en leche.

Se corrieron 20 curvas de una misma leche líquida no pasteurizada a la cual se le agregó una concentración conocida de Penicilina G Sódica correspondiente al punto S (1.0 UI/ml) de la curva estándar.

Con los promedios obtenidos de las lecturas de los puntos S y S (referencia), se calculó la desviación estándar y el porcentaje de error, con lo cual pudimos establecer que el método es preciso y exacto.

Además se analizaron 55 muestras de leche de las cuales 40 eran no pasteurizadas y 15 pasteurizadas, recolectadas de diferentes puntos de la ciudad capital, de dichas muestras no se

obtuvo en ningún caso presencia de halos de inhibición.

El Método de Difusión en Agar para Detectar Residuos de Antibióticos en Leche, no presenta complicaciones, pues su procedimiento es sencillo y el *B. subtilis* utilizado es una cepa bastante resistente a la contaminación, además obtenemos resultados precisos en un mínimo tiempo.

## II. INTRODUCCION

En Guatemala, la leche aporta una de las principales fuentes de alimentos y representa un papel importante en la economía del país, debido a la variedad de productos derivados para el consumo.

Para asegurar la salud del consumidor, la leche debe ser obtenida de vacas sanas, procesarse en condiciones higiénicas adecuadas, de un alto valor nutritivo y estar libre de sustancias nocivas (1, 2, 3).

Lamentablemente a veces se encuentran residuos de ciertos antibióticos (ej. Penicilina y Tetraciclina) y drogas (ej. Sulfonamidas) que contribuyen significativamente en el control de enfermedades del ganado lechero. Los antibióticos y drogas son administrados en forma oral o inyectados y desafortunadamente ambas vías permiten al antibiótico o droga difundirse hasta la leche y permanecer en ella aún cuando ésta sea en polvo, de esta manera ocasiona problemas al productor y al consumidor (5, 7, 9).

Uno de los mayores inconvenientes de la utilización de antibióticos de uso clínico en forma masiva e indiscriminada en las explotaciones de animales es el desarrollo de resistencia por parte de algunos microorganismos patógenos, lo que puede compro



meter el uso terapéutico de estos productos en el propio hombre (2, 4, 5).

Por lo tanto el uso de antibióticos en producción animal y sus residuos en la leche deben vigilarse seriamente.

Los ensayos microbiológicos para la detección de antibióticos en leche son varios, siendo el más utilizado el de Difusión en Agar. Este método presenta dos variantes: utilizando cilindros de acero y *Sarcina lutea* ATCC 9311 o discos de papel y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (18, 22, 23, 28).

Con el propósito de establecer un método simple, rápido y práctico, se estandarizará el Método de Difusión en Agar usando discos de papel y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 como microorganismo de prueba.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Composición y Valor Nutritivo de la Leche

La leche es una mezcla compleja de sustancias alimenticias orgánicas e inorgánicas: agua, grasas, carbohidratos, sales minerales, gases, enzimas y vitaminas (1-3).

Los componentes de la leche pueden clasificarse en dos grupos: el del agua, que actúa como medio de transporte, sosteniendo a los sólidos parcialmente en solución y el de los sólidos totales, los cuales a su vez se dividen en: a) sólidos grasos y b) sólidos no grasos (3-5).

##### a. Sólidos Grasos

Están constituidos por la grasa láctea que es una mezcla de triglicéridos que constan de glicerina y diversos ácidos grasos insaturados (2-4).

La grasa se encuentra suspendida en una emulsión cuyo peso es menor que el agua y esto hace que asciendan a la superficie y formen la crema cuando la leche se encuentra en reposo (3, 4).

## **b. Sólidos no Grasos**

### **1. Lactosa**

La lactosa es el componente de mayor concentración en la leche, está formada por una molécula de glucosa y una de galactosa se clasifica como azúcar reductor de la leche debido a que al accionar con sustancias nitrogenadas causa una disminución en el valor nutritivo de las proteínas (3-5, 7).

La lactosa es una fuente energética, ayuda a la fermentación ácida en el intestino, disminuye el desarrollo de toxinas derivadas de materia en descomposición y contribuye a la asimilación de calcio; propiedad de gran importancia en la nutrición juvenil (4, 6, 7).

### **2. Proteínas**

La proteína láctea está formada de una mezcla de numerosas fracciones protéicas diferentes y de pesos moleculares distintos, la proteína característica de la leche es la caseína, además se encuentran la albúmina y la globulina (3, 4, 6, 7).

La caseína es estable al calor y constituye en la leche de la mayoría de los rumiantes, la fracción principal de la proteína (3, 4).

La albúmina es la proteína de la leche que se encuentra en menor cantidad que la caseína, ésta es muy semejante a la albúmi

na del suero sanguíneo y pasa casi sin variar desde la sangre a la leche, se desnaturaliza con facilidad al calentarla (3-5, 7).

Las globulinas de la leche son proteínas de alto peso molecular que se encuentran preformadas en la sangre (6, 7).

### **3. Minerales**

La leche contiene una variedad de elementos disponibles para el organismo tales como: calcio, magnesio, hierro etc. Estos elementos son utilizados con diferentes propósitos: el calcio y el fósforo intervienen en la osificación, el hierro es una parte integral de la proteína hemoglobina que es la encargada del transporte del oxígeno en la sangre (3-5, 7).

### **4. Vitaminas**

Las vitaminas de mayor concentración en la leche son A y D, las cuales se encuentran disueltas en la materia grasa; su mecanismo de acción está relacionado con el de ciertas proteínas y minerales. Además se encuentra presente la vitamina B o factor antianémico y las vitaminas C, E y K en menor proporción (2, 4, 7).

En la leche podemos encontrar además de lo mencionado, otras sustancias que incluyen fosfolípidos, gases, células somáticas y algunas bacterias no patógenas al hombre (5, 6, 8).

## **B. Mastitis**

La enfermedad más común en el ganado lechero y que causa mayores problemas en la leche es la mastitis, la cual consiste en una irritación o inflamación de la glándula mamaria de las vacas, producida por agentes físicos o infecciosos que provocan alteraciones patológicas localizadas en la ubre y cambios fisicoquímicos en la composición de la leche (5, 7, 9-11, 14).

Los síntomas varían desde algunos coágulos en la leche, a leche extremadamente anormal y ubre roja, inflamada y febril, en casos graves se puede generalizar la infección y sobrevenir la muerte (7-11).

La mastitis puede ser causada por un gran número de organismos que infectan la ubre. La bacteria Streptococcus agalactiae ha sido el microorganismo más involucrado, algunas veces intervienen organismos como las Pseudomonas y las levaduras, así como las bacterias del tipo de los Staphylococcus (10, 12-14).

Las infecciones son estimuladas al ordeñar con una mani

pulación inadecuada de la ubre y por malas técnicas de ordeño. Los gérmenes de infección abundan en el medio en que vive la vaca y cualquier enfriamiento por una helada puede determinar que produzca una infección grave (12, 14).

A nivel de laboratorio, es posible diagnosticar la enfermedad mediante el recuento de células somáticas en la leche y por el aislamiento del microorganismo causal en medios de cultivo específicos (7, 10, 14).

El tratamiento con antibióticos no basta para combatir la mastitis, deben sostenerse siempre prácticas de explotación muy cuidadosas, los tratamientos solo deben aplicarse cuando el examen del animal haya revelado cuál es el microorganismo que causa la enfermedad. En algunos casos, pueden introducirse antibióticos en la ubre o inyectarlos por vía intramuscular (7, 9, 10).

Cuando se apliquen antibióticos se debe evitar el enviar la leche al mercado durante un período de tres a nueve días después del tratamiento o según las características de la medicación; para evitar que los consumidores ingieran el antibiótico (11, 13, 14).

Es importante establecer un estricto control en el ganado lechero para detectar a tiempo la enfermedad, especialmente si se trata de casos subclínicos, los cuales la mayoría de veces pasan

desapercibidos causando grandes pérdidas económicas y constituyen una elevada fuente de contaminación al consumidor ( 5, 10).

### C. Antibióticos

#### a. Diferentes Usos de los Antibióticos

Primordialmente los antibióticos se usan para combatir las enfermedades infecciosas, pero también para otros propósitos. En la década de 1,950 por ejemplo, se dieron a conocer los primeros resultados demostrativos que un animal joven que ingiere pequeñas cantidades de antibióticos en su dieta, puede consumir una cantidad más grande de alimento y aumentar en forma significativa su ganancia de peso por unidad de alimento. Al mismo tiempo los antibióticos dan cierta protección contra las infecciones y esto ayuda también, indirectamente a lograr un mejor crecimiento. Desde ese entonces la práctica de adicionar antibióticos a la alimentación animal ha aumentado considerablemente. Los más usados son: Penicilina, Clorotetraciclina y Oxitetraciclina (Terramicina) (7, 8, 11).

Normalmente se agrega alrededor de 20 a 40 g. de antibiótico por tonelada de alimento (ppm) y a veces cantidades más grandes.

Una práctica más reciente y más sencilla es la de mezclar el antibiótico con la sal que consume el ganado (13, 14).

## **b. Resistencia de las Bacterias a los Antibióticos**

A pesar de los buenos resultados que el uso de antibióticos ha tenido, comenzaron las preocupaciones ya que el uso de los mismos podría tener efectos contraproducentes, por las razones siguientes:

1. Se sabe que los diferentes antibióticos y las sulfonamidas administrados en cantidades subterapéuticas, favorecen la selección y el desarrollo de bacterias resistentes a ellos.
2. Se ha observado que la prevalencia de bacterias resistentes está aumentando, tanto en los animales como en el hombre, lo que se atribuye al uso indiscriminado de antibióticos y sulfonamidas (15-17).

Ciertas bacterias poseen una resistencia natural a determinados antibióticos mientras que la resistencia adquirida se debe a un contacto prolongado con los mismos (15-17).

La ingestión repetida de alimentos con residuos de antibiótico puede dar lugar al desarrollo de resistencia en el mismo organismo humano, sin embargo, lo que más causa resistencia en el hombre es el uso indiscriminado e inadecuado de medicamentos que contienen antibiótico, por ejemplo: la resistencia a la Penicilina se desarrolla con cierta lentitud, mientras que la resisten



cia a la Estreptomocina ocurre muy rápidamente y en grado considerable. (16, 17).

**c. Uso de Antibióticos en Zootecnia, en Guatemala**

En nuestro país, ciertos concentrados comerciales se preparan con agregados de antibióticos y la mayor parte de ellos se vende para ser consumido por aves, cerdos y terneros. En el caso del ganado adulto los antibióticos se usan poco como aditivos en la alimentación, sobre todos por razones de costo (25, 17).

Otra práctica poco recomendable es la de agregar antibióticos a la leche para conservarla mejor durante el transporte de la hacienda hacia la planta pasteurizadora (17).

Desafortunadamente, el control de residuos en alimentos para uso en el mercado interno es prácticamente inexistente.

Además no se cuenta con reglamentación relativa al uso de los antibióticos; éstos se consiguen fácilmente sin prescripción profesional y se usan indiscriminadamente (16, 17).

Los antibióticos que normalmente aplican los ganaderos en el orden de preferencia son: Penicilina, Tetraciclina, Estreptomocina normalmente en combinación con Penicilina, Neomicina y Eritro-

micina.

El Cloranfenicol (Cloromicetina) que antes se usaba extensamente, se utiliza ahora en cantidades menores a causa de un aumento de resistencia en las bacterias. En lugar de Cloranfenicol se están usando más y más las Sulfonamidas (10, 14, 17).

La presencia de antibióticos en la leche y en los productos lácteos no ha dejado de suscitar objeciones por parte de las autoridades sanitarias. La aparición de reacciones alérgicas graves en individuos tratados con penicilina, justifica la sospecha que la presencia de este antibiótico en la leche ingerida puede desempeñar algún papel tanto en la sensibilización de las colectividades humanas como en la aparición de síntomas de choque alérgico en las personas sensibilizadas. Se ha demostrado que la penicilina contenida en la leche puede producir erupciones eczematosas recidivantes en las personas sensibilizadas que beben mucha leche (9, 10, 16-19).

Los antibióticos pueden eliminarse después de un tratamiento intramamario, del mismo modo que tras un tratamiento general o una aplicación intrauterina (13, 14, 19-21).

En la leche las concentraciones más altas de antibióticos son las que resultan de la introducción directa del medicamento

en la glándula mamaria, pues si bien una fracción de la dosis administrada pasa a la corriente sanguínea o es inactivada, la mayor parte se elimina en la leche en los ordeños sucesivos (14, 18, 19).

El tiempo de persistencia total de los residuos de antibióticos depende del tipo de preparado empleado y sobre todo de las propiedades físicas del disolvente utilizado. La administración de grandes dosis de antibióticos por inyección intramuscular o intravenosa o por vía intrauterina puede ir seguida de la eliminación parcial del producto a través de la glándula mamaria (13, 16, 17).

Los antibióticos se encuentran unidos a la fase acuosa de la leche, cuando se desnata una leche entera que contiene un antibiótico, la mayor concentración del medicamento aparece en la leche desnatada y la menor en la nata.

Se ha demostrado que la estabilidad de la penicilina alcanza prácticamente su nivel máximo al pH habitual de la leche y que la pasteurización no influye sobre la actividad de ese antibiótico, del mismo modo, la actividad biológica de las Tetraciclinas, del Cloranfenicol o de las Estreptomocinas, no se altera con un calentamiento rápido de la leche a 80°C (7, 19, 20).

La detección de residuos de Antibióticos en leche es de suma importancia debido a lo siguiente:

- Pueden causar reacciones serias al consumidor. (Ejemplo: erupciones eczematosas)
- La presencia de residuos de antibióticos es totalmente ilegal.
- Son capaces de interferir con los procesos de productos de leche y quesos.
- Los residuos pueden deberse a que los animales se encuentran con una seria infección (7, 15, 19, 20).

#### D. Detección de Residuos de Antibióticos

En 1975 la Administración de Alimentos y Drogas (FDA), adoptó el método de cilindros en placa con *Sarcina lutea* ATCC 9311 como ensayo oficial para la detección de Penicilina en leche y productos lácteos. Más tarde la FDA aceptó el uso del método de discos de papel usando *Bacillus subtilis* ATCC 6633 para la evaluación y detección de productos farmacéuticos individuales y como método satisfactorio para detectar antibióticos en leche (18, 22-24).

**a. Método de Cilindros en Placa**

El método de cilindros en placa es un método cuantitativo que en la actualidad puede utilizar *Sarcina lutea* o *Bacillus stearothermophilus* ATCC 10149 como organismos de prueba (18, 19, 21, 23, 25).

Este método puede emplearse tanto para leche en polvo como para leche fluida. Cuando se utiliza leche fluida entera, ésta se usa como control diluyente en lugar de la leche en polvo más el buffer diluyente preparado bajo el procedimiento para preparación de la curva estandar.

La leche entera normal que va a ser usada como control diluyente debe ser probada antes para asegurarse que no exhibe actividad antibacteriana contra el organismo de prueba (23, 25).

Estos microorganismos son sensibles a los antibióticos y se manifiestan presentando halos de exhibición en el medio, los cuales presentan tamaños proporcionales a la concentración de antibiótico presente en la muestra (21, 23, 25).

Para este método no se necesita preparación de la muestra, en todos los casos las muestras de leche deben de ser frescas. Si una muestra de leche se sospecha que contiene penicilina a un

nivel mayor de 0.2 u/ml, debe ser diluida con el diluyente control hasta un estimado de 0.05 u/ml antes de ser analizada (21, 23, 24, 25).

**b. Método de Discos de Papel**

Para el método de discos de papel puede usarse Bacillus subtilis ATCC 6633 o Bacillus stearothermophilus ATCC 10149 como microorganismos de prueba, este método es el oficial para la detección cualitativa de sustancias inhibitorias en la leche, pero que puede modificarse a cuantitativo, si se corre una curva estandar a la par de las muestras, como se realiza para medir potencia antibiótica de medicamentos (24, 25-31).

El B. subtilis es sensible a la mayoría de antibióticos, se usa en su fase esporulada previa estandarización espectrofotométrica, la presencia de antibióticos se manifiesta por la aparición de halos de inhibición alrededor de los discos, cuyo tamaño será proporcional a la concentración de antibiótico presente en la muestra (18, 21, 22).

El método de discos de papel puede aplicarse tanto a leche en polvo como a leches fluidas frescas, no necesita preparación de muestras (21, 26, 27).

Se encontró mediante una serie de ensayos, que los mejores métodos para detectar sustancias inhibitorias, son el de cilindros en placa utilizando *Sarcina lutea* ATCC 9311 el cual es sensible a 0.01 unidades de penicilina/ml de leche (0.006 ppm) y *B. subtilis* ATCC 6633 por el método de discos de papel, sensible a 0.05 unidades de penicilina/ml de leche (0.03 ppm) (18, 30, 31, 33).

c. Otros Métodos

Otro método aplicable a la industria para la detección de sustancias inhibitorias y que puede ser utilizado como prueba cualitativa es el Delvotest-P. La prueba se realiza utilizando un microorganismo termófilo (*B. stearothermophilus*) en forma esporulada (25, 27, 32, 34-36).

Este microorganismo es sensible a la mayoría de inhibidores en especial a los antibióticos.

Las esporas permanecen sin multiplicarse hasta el momento de la adición de sustancias nutritivas, permitiendo un desarrollo del microorganismo, lo cual se manifiesta por producción de gas y viraje del color del medio. Cuando la leche se encuentra contaminada con sustancias inhibitorias no se lleva a cabo la proliferación bacteriana y el medio permanece sin ningún cambio (18,24).

Existen otros métodos más sofisticados como lo son el Multitest y La Cromatografía líquida con Fluorescencia. El Multitest emplea una caja con gran número de pequeños pozos y una pipeta calibrada, con lo cual pueden realizarse varias pruebas a la vez, es una prueba cualitativa al igual que el Delvotest. El método de Cromatografía líquida con Fluorescencia consiste en separ las muestras haciéndolas correr en una fase líquida, luego se identifican por su color fluorescente, observándolas con lámparas ultravioleta (35,36).



#### IV. JUSTIFICACIONES

Debido al uso indiscriminado de antibióticos en la industria lechera y a los problemas que puede causar su presencia en la leche y productos lácteos, se hace necesario realizar investigaciones de referencia que contribuyan a evitar riesgos a la salud del consumidor y a mejorar la calidad del producto.

A consecuencia de no existir en Guatemala, un programa de control sanitario que garantice la ausencia de antibióticos en la leche, es necesario contar con un método de determinación de los mismos, usando *Bacillus subtilis* ATCC 6633, de tal forma que pueda ser adoptado en los procedimientos rutinarios para el control de calidad de la leche en el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM).

## V. OBJETIVOS

1. Establecer en el Laboratorio de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM), un método microbiológico rápido y práctico para la detección de residuos de antibióticos en leche.
2. Demostrar que el método microbiológico de Difusión en Agar utilizando *B. subtilis* ATCC 6633 y discos de papel, es un método preciso y exacto para la detección de residuos de antibióticos en leche.
3. Comprobar si las leches están libres de residuos de antibióticos.

## VI. HIPOTESIS

El método de Difusión en Agar, utilizando *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y discos de papel, es un método exacto y preciso para la detección de antibióticos en leche.

## VII. MATERIALES Y METODOS

### A. Universo de Trabajo

El universo de trabajo estará conformado por 25 muestras de leche que ingresen al Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM), durante los meses de junio-julio de 1992, y 25 muestras recolectadas de 5 puntos tomados al azar, de la ciudad capital.

### B. Medios

#### a. Recursos Humanos

Autor: Blanca Isabel Escalante Bautista.

Asesor: Licda. Teresita Aguilar de Miranda.

#### b. Materiales y Equipo

- Incubadora regulada entre 35 y 37°C
- Refrigeradora
- Balanza analítica
- Balanza semianalítica
- Horno Esterilizador de calor seco
- Potenciómetro
- Autoclave
- Agitador Mecánico (Vortex)
- Baño de María regulado a 48-50°C

- Baño de María regulado a 60°C
- Estufa con Magneto
- Espectrofotómetro
- Mechero
- Asa de inocular
- Lector de Halos o regla de Vernier
- Gradillas con teflón
- Centrífuga
- Espátulas
- Magnetos
- Beaker de acero inoxidable de 1000ml.
- Pinzas
- Pipetas Pasteur
- Perlas de Vidrio
- Cajas Petri de 100\*25 mm.
- Balones aforados de 10 y 25 ml.
- Pipetas graduadas de 1 ml (1/100), 5 ml (1/10), 10 ml (1/10) y 25 ml (1/10)
- Erlen Meyer de 50 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml.
- Botellas Roux de 150 ml
- Probetas de 1000, 500, 100 y 50 ml
- Agua Destilada
- Solución Salina
- Agua Esteril

- Discos de papel de 1/2 pulgada (comprados, de la marca Schleicher & Shuell).

#### C. Microorganismo de Prueba, Medios y Reactivos

- Microorganismo de prueba : *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (22, 27).
- Medio de Crecimiento y Mantenimiento de *B. Subtilis* (ver anexo No. 1).
- Medio de Agar para el ensayo (ver anexo No. 2).
- Solución diluyente para el estandar de penicilina (ver anexo No. 3).
- Solución diluyente para la curva estandar.
- Penicilina G, estandar de trabajo.
- Penicilinasas (beta-lactanasas). Las preparaciones pueden ser adquiridas en Difco.

#### D. Diseño de Investigación

El diseño estará basado en un análisis Descriptivo, con lo siguiente:

1. Una Evaluación de Exactitud y Precisión del Método.
  - Exactitud del método, mediante la determinación de Coeficiente de Varianza C.V.

- Precisión del método, mediante la determinación del Índice de Varianza I.V.

Las cuales se determinarán haciendo 20 lecturas de una misma leche, con una cantidad conocida de antibiótico introducido.

2. Estudio en el Campo, con leches líquidas pasteurizadas y no pasteurizadas, el cual por conveniencia será de 50 muestras para determinación de:

- Presencia o no de antibiótico (%).
- Cuantificación de las muestras positivas (X, S).

#### **E. Procedimiento**

##### **a. Preparación del Microorganismo de Prueba:**

1. Sembrar profusamente el slant de una botella Roux, que contenga medio antibiótico # 1 con *E. subtilis* e incubar 48 h. a  $35 \pm 37^{\circ}\text{C}$ , luego dejar esporular a temperatura ambiente durante 8 días.
2. Levantar el crecimiento con 10 ml. de solución salina, con la ayuda de perlas de vidrio estériles. Centrifugar, decantar el sobrenadante, calentar en

baño de María a 60°C durante 30 minutos (shock térmico), repetir.

Centrifugar, decantar el sobrenadante.

**3. Suspensión de trabajo.**

Ajustar el espectrofotómetro a 100% de transmitancia usando solución salina, a una longitud de onda de 580 nm. Determinar la cantidad de suspensión concentrada que hay que agregar a 9 ml. de solución salina para obtener una transmitancia de  $25\% \pm 1$ . Con la suspensión anterior preparar una dilución de acuerdo al volumen requerido de trabajo, usar 2 ml. para 100 ml. de medio de cultivo (21, 27).

**b. Preparación de las Cajas:**

1. Colocar 15 ml. de Medio Antibiótico # 1 a cada caja Petri. Distribuir el medio de manera que quede toda la superficie a un mismo nivel y dejar solidificar.
2. A otra parte de Medio # 1 mantenido en el baño de María a 50°C, agregarle el microorganismo de prueba evaluado al 2%, verificar 6 ml. del medio perfectamente mezclado, en cada caja de petri y dejar soli-



dificar (27).

3. Usar las cajas el mismo día que se preparan.

c. Preparación de la Curva Estándar:

1. Preparar una solución stock de penicilina G, disolviendo aproximadamente 10 ml. del estándar de penicilina en 10 ml. de buffer de fosfatos, para obtener una solución patrón concentrada.

Esta solución puede usarse por 2 días, guardarla en refrigeración. (4°C)

2. Preparar un diluyente control con el buffer de fosfato y la leche en polvo estéril, en una concentración de 20 ml. de buffer por 1 g. de leche. Hacer diluciones posteriores del stock de penicilina G en el diluyente control para obtener las siguientes concentraciones:

0.125   0.25   0.5   1   y   2

tomando 0.5 como referencia, para  $S_3 = 0.5$  U.I./ml

3. Usar 16 cajas de Petri preparadas como se indica en el inciso 2 y preparar grupos de cuatro cajas cada

uno. Utilizar cada grupo para cada una de las concentraciones de trabajo:  $S_1 = 0.125$ ,  $S_2 = 0.25$ ,  $S_3 = 1$ ,  $S_4 = 2$ , preparadas anteriormente. Usar la solución de trabajo  $S = 0.5$  U.I./ml como referencia e incluirla en todas las cajas.

4. Con una pinza limpia y flameada, tomar un disco de papel y acercarlo a la superficie de la muestra o punto de la curva (previamente bien mezclada) y dejar que absorba leche por acción capilar. Secar el exceso de leche haciendo tocar el disco de papel en el borde del recipiente.  
Inmediatamente colocar el disco sobre la superficie del agar presionando suavemente para asegurar el contacto (Anexos figura No. 1).  
Invertir la placa e incubar a  $35 - 37^\circ\text{C}$  por 16 a 18 horas.
5. Medir las zonas de inhibición con un lector de halos o Regla de Vernier.
6. Promediar las lecturas de la concentración de 0.5 U.I./ml. y las lecturas del punto probado sobre cada grupo de cuatro placas, también promediar las

32 lecturas de la concentración de 0.5 U.I./ml., este promedio es el punto de corrección para la curva.

7. Corregir el valor promedio de la concentración de 0.5 U.I./ml. en cada uno de los cuatro grupos, ejemplo: si el promedio de las 32 lecturas de la concentración de 0.5 U.I./ml. es de 20 mm. y el promedio de los 8 discos de 0.5 U.I./ml, en el grupo de 4 placas con 0.25 U.I./ml. es de 19.8 mm., la corrección es de + 0.2 mm.

Si el promedio de lectura para los 8 discos con 0.25 U.I./ml. en estas 4 placas es de 17.0 mm., el valor correcto sería de 17.2 mm.

8. Plotear los valores corregidos, incluyendo el promedio de la concentración de 0.5 U.I./ml., sobre un papel semilogarítmico de 2 ciclos, colocando la concentración en U.I./ml. sobre la escala logarítmica y el diámetro de la zona de inhibición sobre la escala aritmética.

9. Construir la mejor línea recta a través de estos puntos por visualización o usando las siguientes ecuaciones:

$$L = \frac{(3a + 2b + c - e)}{5}$$

$$H = \frac{(3e + 2d + c - a)}{5}$$

donde L y H son los diámetros calculados de las zonas de inhibición de las concentraciones más bajas y más altas (0.125 y 2 u/ml respectivamente) de la línea de respuesta estándar;

c = promedio del diámetro de zona de 32 diámetros de zona para la concentración de referencia.

a, b, d, e = promedio de diámetro de zonas corregidas para cada una de las otras concentraciones usadas para la línea de respuesta estándar (27).

**d. Preparación de la Muestra:**

Tomar aproximadamente 25 ml. de leche, mezclar perfectamente y proceder como en el inciso 4; colocando siempre el S como referencia en las 4 cajas. si hay presencia de halos de inhibición, comprobar la actividad como penicilina; tomar una porción de muestra, agregar concentrado de Penicilinas en proporción de 0.5 ml/10 ml. de muestra, incubar a  $35 \pm 37^{\circ}\text{C}$ .

La zona de inhibición de la muestra sin tratamiento y no zona con muestra tratada con Penicilina es una prueba positiva para Penicilina G (27).

**e. Cálculo de la Potencia:**

Promediar las zonas de lectura del estándar y las lecturas de zona de muestras sobre 4 placas. Si el promedio del tamaño de la zona de la muestra es mayor que el promedio del estándar, agregar la diferencia entre ellos al tamaño de la zona del estándar de referencia sobre la curva.

De la curva, leer la concentración correspondiente para ajustar el tamaño de la zona de la muestra. Multiplicar la concentración en unidades/ml. por el factor de dilución de 4 X para obtener una concentración final de Penicilina G en unidades/g. (27).

$$C - B + A = D$$

Donde:

A = promedio de zonas de la muestra.

B = promedio de zonas del estándar.

C = promedio de los 4 promedios de zonas del estándar.

D = valor corregido de las zonas de la muestra.

**f. Controles:**

Cuando se hacen estos procedimientos de ensayo, el analista debe tener la certeza que cualquier actividad de antibiótico detectada deriva unicamente de la muestra y no de condiciones del ambiente (incluyendo al propio analista), del equipo o reactivos usados. Las buenas prácticas de laboratorio requieren el uso de controles apropiados; esto debe incluir controles para indicar el grado de precisión y seguridad de las determinaciones a reportar.

La concentración estándar más baja (0.125) se puede tomar como un control que siempre va a producir resultados negativos. Esta concentración tan baja representa el diluyente control en la cual la droga ha sido agregada en un nivel que normalmente se encuentra abajo del límite de detectabilidad.

En ocasiones, la concentración más baja (0.125 U.I./ml.) puede producir una zona medible de inhibición. La siguiente concentración (0.25 U.I./ml.) siempre va a dar resultados positivos. La sensibilidad de este método normalmente es de 0.01 U.I./ml. (27).

## VIII. RESULTADOS

Se analizaron 20 curvas corridas con una misma leche líquida no pasteurizada tomada al azar, por el Método de Difusión en Agar con discos de papel y *Bacillus subtilis*.

Los 20 promedios obtenidos de las curvas fueron bastante similares, obteniéndose una Desviación Estándar de 0.84 y un Error de 0.45 % (ver tabla No. I).

Además se analizaron 55 muestras de leche líquida de las cuales 40 fueron no pasteurizadas tomadas de diferentes puntos de la ciudad capital y 15 muestras de leche pasteurizada de diferentes marcas (ver tabla No. II)

Ninguna de las 55 muestras presentó halos de inhibición.

## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

El Método de Difusión en Agar usando discos de papel de media pulgada de diámetro y *Bacillus subtilis*, fue un método microbiológico simple, rápido y práctico para detectar residuos de antibióticos en leche.

Cuando se estandarizó la metodología ésta no presentó complicaciones ya que el procedimiento es sencillo y el *B. subtilis* es una cepa muy estable y resistente a la contaminación, por lo que los resultados obtenidos fueron reproducibles.

Para evaluar si es un método preciso y exacto para detectar residuos de antibióticos, se corrieron 20 curvas de una misma leche líquida no pasteurizada y tomada al azar, a la cual se le agregó una concentración de Penicilina G Sódica correspondiente al punto  $S_3$  (1.01 UI/ml) de la curva estándar.

Con los promedios obtenidos de las lecturas de los puntos  $S_4$  y los  $S_3$  de referencia (tabla No.1), se calculó la Desviación Estándar obteniéndose un valor de 0.84, demostrando que los valores varían muy poco respecto a la media, indicando así un alto grado de Precisión del método. Además se obtuvo un Error Estándar de 0.1879 lo que indica que el método presenta un mínimo



error respecto a los resultados, por lo cual podemos decir que es exacto.

Fueron analizadas para complementar el presente estudio, 55 leches líquidas sin hacerles ninguna dilución, de las cuales 40 eran no pasteurizadas y 15 pasteurizadas, en ambos casos se seleccionaron de diferentes puntos y marcas de la capital.

El objeto de analizar estas leches fué el de hacer un pequeño control, para tener una idea de la calidad de nuestras leches, respecto a si están o no libres de residuos de antibióticos.

A las 55 muestras se les corrió la curva estándar con los puntos  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  (referencia),  $S_4$  y  $S_5$ , no encontrándose en ninguna, presencia de halos de inhibición (tabla No.2), por lo cual no se pudo realizar el tratamiento estadístico indicado que consistía en determinar el % de muestras con presencia o no de residuos de antibióticos y una cuantificación de muestras positivas.

## X. CONCLUSIONES

1. El Método de Difusión en Agar utilizando discos de papel de media pulgada de diámetro y *B. subtilis* es un método microbiológico rápido, práctico y sencillo de ejecutar para un gran número de muestras.
2. Es un método preciso y exacto para detectar residuos de antibióticos en leche.
3. El microorganismo de prueba *Bacillus subtilis* ATCC 6633 utilizado en el Método de Difusión en Agar, es bastante resistente a la contaminación y presenta un crecimiento rápido y abundante.
4. Se comprobó que las 55 leches analizadas estaban libres de residuos de antibióticos.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Trabajar las muestras de leche en concentración natural, sin hacer diluciones.
2. Quitar el exceso de muestra de los discos de papel, pasándolos por el borde de la placa de Petri.
3. Hacer las lecturas de los halos, usando mascarilla.
4. Establecer el método de detección de antibióticos en leche, como un procedimiento rutinario para el control de calidad de la leche en el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM).

## XII. REFERENCIAS

1. Hausler WJ. Standard for the examination of dairy products. 13 ed. Washington: American Public Health Association, 1972. 305p. (p. 105-137).
2. Baustillo López J. Métodos instrumentales para la determinación de la calidad higiénica de la leche y de los productos lácteos. *Vía Láctea*. 1979; 11:13-20.
3. Centro Tecnológico de la leche para Chile y América Latina. Universidad Austral de Chile, 1980. 250p. (p. 38, 52-60).
4. Gonzales Inga Hipólito. Características fisicoquímicas que definen la calidad de la leche. *Via Lactea*. 1979;11 :13-19.
5. Blodd Henderson. Medicina Veterinaria. 4 ed. México: Interamericana, 1976. 1350p. (p. 369-377).
6. Foster EM. Microbiología de la leche. Palazon R. trad. México : Herrero, 1965. 875p. (p. 16,74-76,301).

7. Magariños H. Microbiología e Higiene de la leche. Publicaciones del Centro Tecnológico de la leche para Chile y América Latina. Universidad Austral de Chile, 1980. 425p. (p. 132-158).
8. Asociación Americana de Salud Pública. Normas para el Examen de los Productos Lácteos. México: 1963. 150p. (p. 16-17-22).
9. Lerche M. Inspección Veterinaria de la leche. Escobar JE, trad. Zaragoza: Acribia 1969. 560p. (p. 27-35, 213-225).
10. Davis RF. La Vaca Lechera: Su Cuidado y Explotación. México: 1963. 375p. (p. 226-229).
11. Organización Mundial de la salud. Higiene de la Leche. Ginebra, Suiza: 1966. 178p. (488-493).
12. Juergenson EM. Monteson WP. Prácticas Aprobadas en la producción de leche. Quezada g, trad. México: Continental, 1965. 420p. (p. 174-179).

13. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 9o. ciclo de Zootecnia, Tecnología de la Leche. Guatemala: Universidad de San Carlos, 1980.
14. Informaciones Veterinarias. Alemania: Bayer, 1973. 55p. (p. 4 - 9).
15. Brady MS. Ratz SE. Antibiotic/Antimicrobial Residues in Milk. J. of Food prot. 1988; 51:8-11.
16. Marth EH. Ellickson RE. Problems created by the presence of antibiotics in Milk products. J. Milk Food Technol. 1969; 22:266-272.
17. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. Toxi-infecciones de Origen alimentario. Guatemala: 1976 414 p.
18. Galeta JN. et al. Comparison of Comparison of Microbiological Methods for Detecting Penicillin and Penicillin like Antibiotic Residues in Milk J. of Food Prot. 1984; 47:604-610.
19. Van Os. Diffusion test for determination of antibiotics residues in milk. J Milk Dairy. 1975;29:16-34.

20. Aret B. Kirschbaum A. A Rapid Disc Assay Method for Detecting Penicillin in Milk. J. Milk Food Technol. 1959; 22:329-331.
21. Marth EH. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 14 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1978. 416 p. (p. 141-150).
22. Ginn RE. Tatini S, Packard VS. Comparative Evaluation of Milk and Milk Products. J. of Food Prot. 1978;41:361-363.
23. Packard VS, Tatini Sita, Ginn RE. An Evaluation of Methods for Detecting and Comparative Incidence of Penicillin Residues in Different Types of Raw Milk Supplies. J. Milk Food Technol. 1975;38:601-603.
24. Surtherland AK. Antibiotics in Milk. Dairy Farming Digest. 1978;25:25-26.
25. Johnson ME, Martin JH, Parson JG. A Comparison of several Assay Procedures to Detect Penicillin Residues in Milk. J. of Food Prot. 1977;40:785-789.
26. Bishop JR, White CH. Antibiotic Residue Detection in Milk

A Review. J. of Food Prot. 1984;47:647-652.

27. Ouderkirk Larry A. Evaluation of two Microbiological Methods for Detecting Residual Antibiotics in Milk. J. of the AOAC. 1973;59:1122-1124.
28. Balbi GM, Hartmen PA. Highly Sensitive Paper - Disc Assays for Detecting Penicillin in Milk. J. of Food Prot. 1985;48:16-20.
29. Olson JC, Sanders AC. Penicillin in Milk and Products: Some Regulatory and Public Health Considerations. J. Milk Food Technol. 1975;38:630-633.
30. Oliver SP, Maki JL, Dowlen HH. Antibiotic Residues in Milk Following Antimicrobial Therapy During lactation. J. of Food Prot. 1990;53:693-696.
31. Rajkowski KT, Peeler JT, Messer JW. Detectability of E-rythromycin in Elgth Milk Products Using the AOAC Bacillus stearothermophilus Disc Assay. J. of Prot. 1988;51:
32. Peeler JT. et al. Precision Parameters for AOAC Bacillus stearothermophilus Disc Assay Based on FDA milk Labora tory



Quality Assurance 1982 - 1986 Samples. J. of Food Prot.  
1989;52:867-870.

33. McEwen SA, Meek AH, Black WD. A dairy Farm Survey of Antibiotic Treatment Practices, Residue control Methods and Associations with inhibitors in Milk. J. of Food Prot. 1991;54:454-459.
34. Schothorst M, Leusden F, Nouws FM. Antibiotic Residues: Regulations, Tolerances, and Detection in European Economic Community. J. Assoc. of Anal. Chem. 1978;6161:1209-1213.
35. Van Os JL, Reukers R. A Multitest System for Detection of Antibiotics in Milk. J. of Food Prot. 1980;43:510-511.
36. Munns RK. et al. Multiresidue Method for Determination of Eight Neutral B-Lactam Penicillins in Milk by Fluorescence-Liquid Chromatography. J. Food Prot. 1984;47:647-652.

XIII. ANEXOS

## ANEXO # 1

### Medio de Crecimiento y Mantenimiento de *B. subtilis*

Extracto de Carne	1.5 g.
Extracto de Levadura	3.0 g.
Caseína	4.0 g.
Peptona	6.0 g.
Dextrosa	1.0 g.
Bacto Agar	15.0 g.
Sulfato de Manganeso	0.3 g.
Agua Destilada	1000 ml.

Ajustar a pH  $6.6 \pm 0.1$

Hervir el medio, y dispensar en botellas Roux 100 ml., esterilizar a 121°C por 15 minutos (18, 22, 27).

#### Nota:

El medio utilizado es una mezcla preparada comercialmente: Antibiotic Medium # 1 Dehydrated de Difco Laboratories, al cual unicamente se le agrega el Sulfato de Manganeso.

## ANEXO # 2

### Medio de Agar para el Ensayo:

Extracto de Carne	1.5 g.
Extracto de Levadura	3.0 g.
Caseína	4.0 g.
Peptona	6.0 g.
Dextrosa	1.0 g.
Bacto Agar	15.0 g.
Agua Destilada	1000 ml.

Ajustar a pH  $6.55 \pm 0.05$

Hervir el medio hasta que se disuelva completamente, esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 lbs. de presión y  $121^{\circ}\text{C}$ .

#### Nota:

El medio utilizado es una mezcla preparada comercialmente: Antibiotic Medium # 1 Dehydrated de Difco Laboratories.

### ANEXO # 3

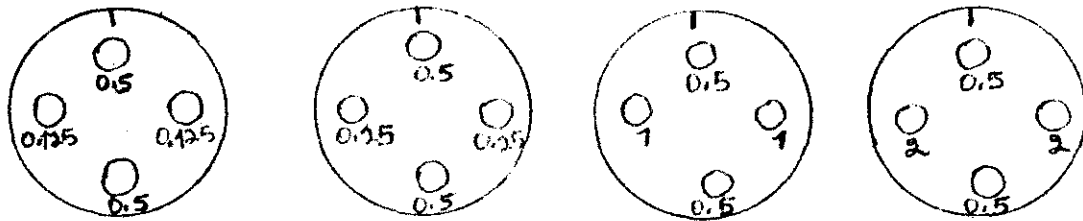
#### Solución Diluyente para el Estándar de Penicilina:

Fosfato de Potasio Monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	8.0 g.
Fosfato de Potasio Dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )	2.0 g.
Agua Destilada	1000 ml.

Disolver completamente las sales, verificar el pH el cual debe ser de  $6.0 \pm 0.1$ , esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 lbs. de presión (18, 21, 22).

FIGURA # 1.

Forma de colocar los discos impregnados, sobre las placas de Agar Medio Antibiótico # 1.



Hacer una marca en la caja, la cual indicará la posición No. 1.

En las posiciones 1 y 3 se colocan discos con la dilución de Referencia  $S_3 = 0.5$  U.I./ml.

En las posiciones 2 y 4 se colocan discos con las demás diluciones hacer 4 placas para cada dilución. (1, 15, 18, 19, 27).

TABLA No. 1

PROMEDIOS DE LECTURAS DE HALOS

No.	Promedio $S_1$ (UI/ml) ↑	Promedio $S_3$ (UI/ml)	Promedio $S_4$ Corregido (UI/ml)
1	22.20	19.51	22.15
2	21.20	19.28	21.05
3	19.07	19.06	19.13
4	21.70	19.53	21.62
5	21.04	19.49	21.31
6	20.75	19.17	20.87
7	20.51	19.26	20.46
8	21.00	19.19	20.98
9	22.11	19.35	21.98
10	22.30	19.43	22.48
11	21.25	19.30	21.37
12	21.78	19.40	21.82
13	21.25	19.35	21.22
14	22.10	19.24	22.20
15	19.72	19.58	19.75
16	22.17	19.57	22.32
17	21.43	19.36	21.51
18	21.83	19.32	21.88
19	21.33	19.36	21.29
20	20.27	19.21	20.33

TABLA No. 2

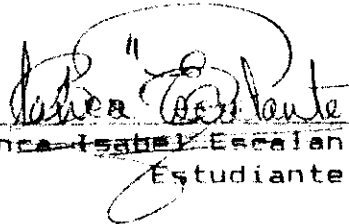
LECHES ANALIZADAS

---

No.	Leche Líquida	Presencia de Antib.
40	No pasteurizadas	0
15	Pasteurizadas	0
TOTAL 55		0

---





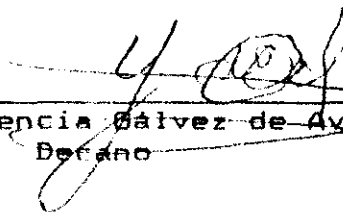
Blanca Isabel Escalante Bautista  
Estudiante



Licda. Terésita Aguilar de Miranda  
Asesor



Lic. Gustavo Gini Aguilera  
Director



Licda. Clemencia Bálvez de Avila  
Defensor

PROVINCIA DE LA DEFENSIÓN DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central