

105  
2ej

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

GRADO DE CONTAMINACION CON RESIDUOS DE  
CLORANFENICOL Y NOVOBIOCINA DE LA LECHE  
COMERCIAL QUE SE CONSUME EN EL DISTRITO FE-  
DERAL Y SU AREA METROPOLITANA.

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

CESAR RAUL SANCHEZ HERNANDEZ

DIRECTOR: DR. MARCELO PEREZ DOMINGUEZ  
ASESOR: Q. FRANCISCO VELAZQUEZ QUEZADA



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E .

RESUMEN	I
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	5
HIPOTESIS	7
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y METODOS	8
RESULTADOS	17
DISCUSION DE LOS RESULTADOS	20
CONCLUSIONES	22
CUADROS	23
BIBLIOGRAFIA CITADA	37

## RESUMEN.

Se evaluó la especificidad de la técnica microbiológica de difusión de cilindro en placa, para la detección de residuos de cloranfenicol y novobiocina, en leche pasteurizada, la cual es nula, y la sensibilidad - la cual es alta.

Se evaluó la especificidad y la sensibilidad de la técnica de cromatografía en capa delgada, para la detección de residuos de cloranfenicol y novobiocina, en leche pasteurizada, la cual es alta en ambos casos.

Se determinó el porcentaje de contaminación con residuos de inhibidores bacterianos, de leche pasteurizada que se consume en el Distrito - Federal y su área metropolitana, empleando la técnica microbiológica rápida con Bacillus stearothermophilus y se encontró un 55% de muestras - contaminadas.

Se empleó la técnica de cromatografía en capa delgada, para detectar la presencia de residuos de cloranfenicol y novobiocina, se encontró un 3% de muestras contaminadas con residuos de cloranfenicol y 1% con - residuos de novobiocina; en el 51% restante no se determinó el tipo de - inhibidor presente.

Se calculó la concentración de cada una de las muestras positivas a cloranfenicol y novobiocina, empleando la técnica microbiológica de difusión de cilindro en placa, por su alta sensibilidad. Se estimó una concentración mínima para cloranfenicol de 0.3289 mcg/ml y una máxima de - 1.4030 mcg/ml; y una concentración mínima para novobiocina de 0.1719 - mcg/ml y una máxima de 0.3898 mcg/ml.

Aunque el porcentaje de muestras positivas a los antibióticos estudiados es bajo, esta situación no deja de representar un serio peligro - para la salud pública, ya que la peligrosidad de estas drogas y las concentraciones detectadas así lo indican.

## INTRODUCCION.

La leche de vaca es un alimento básico e indispensable para la vida del hombre (1), ya que proporciona proteínas, azúcares, minerales y vitaminas que satisfacen una buena parte de las necesidades del hombre (43), por lo tanto debe formar parte de la alimentación, principalmente de niños y jóvenes (1).

Es recomendado, por los Organismos de salud, que los niños reciban por lo menos 750 mililitros de leche al día hasta los 14 años de edad. Por otro lado, las personas de edad avanzada deben de recibir por lo menos medio litro de leche al día para mantenerse en óptimas condiciones de salud (31). Estudios realizados en 1985 demuestran que el pueblo mexicano consume menos leche en su dieta que los mínimos recomendables. - Se estima que el 40% de la población total del país nunca toma leche y - que el 15% lo hace rara vez. Así mismo el 65% del consumo lo hacen los adultos; el consumo per cápita de este alimento es de 270 mililitros al día (1).

El reglamento para el control sanitario de la leche de la S.S.A. establece en el capítulo Segundo, Artículo 13, fracción VI, que la leche y sus derivados destinados a consumo humano deben de estar libres de sustancias extrañas a su composición normal, tales como bactericidas, bacteriostáticos, preservativos químicos o biológicos, antibióticos o sustancias tóxicas. Para dar cumplimiento a esta regla, es necesario mantener un muestreo constante de estos productos y enviarlos al laboratorio para su identificación, capítulo Décimo segundo, Artículo 134 (35)

Un alimento está contaminado cuando contiene microorganismos, cuerpos extraños o sustancias químicas como hormonas, antibióticos, plaguicidas, toxinas, etc., en cantidades superiores a un límite que las autoridades sanitarias deben de establecer para cada caso (41).

Debido a las características nutritivas de la leche, es indispensable

ble que ésta reúna las condiciones sanitarias adecuadas y que esté libre de contaminantes que puedan causar problemas de salud, como es el caso de los residuos de antibióticos (42).

No siempre es factible, técnica y económicamente, evidenciar la contaminación de los alimentos durante la inspección sanitaria, debido al volumen de los mismos, la falta de personal capacitado, el tiempo y costo que implica realizar las técnicas (21).

Es importante tener en cuenta que el Médico Veterinario no solamente debe curar o salvar la vida del animal enfermo o prevenir enfermedades sino también debe prever que los elementos químicos y biológicos no produzcan la contaminación del animal productor de carne, leche o huevo para consumo humano. Es necesario que se encuentre informado de los agentes que se utilizan para estimular el crecimiento de los animales de abasto, tales como antibiótico, hormonas, arsenicales orgánicos y compuestos anabólicos y de aquellos que se emplean para prevenir o curar enfermedades. El conocimiento de los agentes químicos o biológicos debe comprender la manera de comportarse localmente y dentro del organismo; modo de eliminarse en cuanto a órgano y tiempo y si tiene poder residual en los tejidos destinados a la alimentación humana (21).

Actualmente se están empleando en la alimentación animal preparados de antibióticos, los que en muchos casos superan a los recomendados por los Organismos mundiales (FAO, OMS y otros) como suficientes para estimular el crecimiento animal y adecuadas para no originar residuos en los tejidos (21). Además el uso de drogas en la producción animal se ha hecho tan extenso que aproximadamente entre el 78 y 80% de todos los animales producidos para el abasto reciben medicamentación en una parte o en la mayoría de su vida productiva (3, 22, 28, 40, 45).

Los antibióticos han sido utilizados intensivamente en las explotaciones lecheras en el tratamiento y control de la mastitis. En el tra-

tamiento y control de otras enfermedades se administran los antibióticos por diferentes vías (10, 18). En cualquiera de los casos los antibióticos pasan a la leche por un aparente mecanismo de difusión a través del alveolo (30). Algunos estudios señalan que la eliminación se prolonga por más tiempo de lo que especifica el proveedor (10). Observaciones realizadas sobre la farmacocinética de algunos antibióticos, demuestran que el metabolismo del hígado determina el tiempo de eliminación de los mismos (5).

Debido a que los antibióticos no sufren variaciones y no se inactivan con elevadas temperaturas, también se encuentran residuos en la leche pasteurizada (27) y en todos sus derivados industriales, tales como la mantequilla, la crema y el queso, en donde se reparten estos residuos (39, 41) y comúnmente no afectan las características organolépticas, pero sí su calidad (41).

La presencia de antibióticos en la leche destinada al consumo humano constituye un peligro potencial para la salud pública, ya que son sustancias activas que tienen determinado efecto tóxico en mayor o menor grado (11, 16, 24, 32). Los principales problemas que se presentan están relacionados con:

- a. Sensibilización de personas por el consumo de alimentos tratados con antibióticos (19, 27, 41).
- b. Aparición de reacciones anafilácticas o alérgicas en personas susceptibles (12, 15, 41, 43).
- c. La transmisión de bacterias resistentes del animal al hombre (7, 12, 19, 27) y
- d. El incremento en la probabilidad de aparición de cepas resistentes a los antibióticos como sucede ya con algunas cepas de Salmonella, Escherichia y Staphylococcus (19, 40).

Por ser el cloranfenicol y la novobiocina antibióticos empleados en

las explotaciones lecheras y la práctica del Médico veterinario, el presente trabajo se enfoca a la detección y cuantificación de residuos de estos antibióticos en la leche pasteurizada que se consume en el Distrito Federal y su área metropolitana.

Entre las técnicas empleadas para determinar la presencia de anti-bióticos en la leche encontramos las siguientes:

- a. Técnica microbiológica de difusión de cilindro en placa, emplea da para determinar el antibiótico presente en la leche y su actividad bactericida o bacteriostática,
- b. Técnica microbiológica rápida, que emplea  $3\frac{1}{2}$  horas para detectar la presencia de antibióticos u otros inhibidores, sin identificarlos (36, 44),
- c. Técnica de cromatografía en capa delgada, que posee la característica de identificar el tipo de antibiótico presente en la leche (2, 3, 4, 26).



## GENERALIDADES.

El cloranfenicol (cloromicetina) es un antibiótico de amplio espectro, de acción predominante bacteriostática. Antiguamente fue extraído de los cultivos de un actinomiceto el Streptomyces venezuelae; pero actualmente se prepara por síntesis; es muy estable, poco soluble en agua y muy soluble en alcohol. La forma activa es el isómero levógiro. Actúa sinérgicamente con las tetraciclinas y antagónico con las penicilinas. Esta droga se ha considerado hasta la fecha como el medicamento de elección para el tratamiento de la fiebre tifoidea (11, 13, 23, 33, 37).

La novobiocina también llamada estreptonevicina, cardelmicina, biotexin, tiene acción bactericida o bacteriostática contra gérmenes Gram positivos especialmente a Streptococcus grupo A y viridans y algunos gérmenes Gram negativos como: Proteus, Salmonella, Pasteurella y Klebsiellas. Es producida por el Streptomyces niveus y spnareoides y se utiliza en el tratamiento de mastitis combinándola con penicilina (11). Es muy soluble en metanol, poco soluble en acetona y ligeramente soluble en agua.

La penicilina en general es poco tóxica, pero puede desencadenar reacciones alérgicas al consumir alimentos que la contengan; éstas van desde urticarias con pequeñas pápulas pruriginosas y fiebre, hasta el agudo y mortal choque anafiláctico (6, 17, 23).

La toxicidad de la estreptomina es debida a la lesión que produce en el octavo par craneal y en el aparato vestibular, causando vértigo y sordera, también puede inducir reacciones alérgicas ocasionando fiebre y erupciones cutáneas (6, 17, 23).

Las tetraciclinas pueden causar trastornos gastrointestinales como náuseas, vómito y diarrea, en grado variable, erupciones cutáneas, lesiones en las mucosas y fiebre. Así también se depositan en estructuras óseas y en los dientes, particularmente durante el desarrollo fetal y los primeros seis años de vida (14, 17, 23).

Estudios realizados en niños recién nacidos, cuyas madres durante el embarazo ingirieron novobiocina o cloranfenicol demostraron lo siguiente:

- a. Novobiocina: Hiperbilirrubinemia.
- b. Cloranfenicol: Deficiencia hepática para degradar el antibiótico, lo cual produce niveles séricos muy altos de la droga y un cuadro caracterizado por colapso circulatorio, cianosis y muerte -síndrome gris- (14).

Estudios realizados en 1972 en México durante un brote de fiebre tifoidea demostraron que la mayoría de las cepas aisladas fueron resistentes al cloranfenicol, además a las tetraciclinas y a la estreptomycinina (29). La administración prolongada de cloranfenicol en el hombre provoca discracias sanguíneas y destrucción de células nerviosas en desarrollo (17, 23, 39).

## HIPOTESIS.

La leche pasteurizada que se consume en el Distrito Federal y su área metropolitana, está contaminada con residuos de cloranfenicol y de novobiocina.

## OBJETIVOS.

1. Evaluar la especificidad y la sensibilidad de la técnica microbiológica de difusión de cilindro en placa para la detección de residuos de cloranfenicol y de novobiocina, en leche pasteurizada.
2. Evaluar la especificidad y la sensibilidad de la técnica de cromatografía en capa delgada para la detección de residuos de cloranfenicol y de novobiocina, en leche pasteurizada.
3. Determinar el porcentaje de contaminación con antibióticos de leche pasteurizada que se muestreó en diferentes zonas del Distrito Federal y su área metropolitana, empleando la técnica microbiológica rápida con Bacillus stearothermophilus.
4. Determinar el grado de contaminación con residuos de cloranfenicol y de novobiocina, utilizando la técnica más específica para este fin, en muestras de leche que resulten positivas a antibióticos por la técnica microbiológica rápida.

## MATERIAL Y METODOS.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Proyecto Mastitis, sección Antibióticos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, sector Pecuario, dependiente de la S.A.R.H., - Km. 15.5 carretera México-Toluca, México, Distrito Federal.

I. Para la realización del primer objetivo, se contaminó leche libre de antibióticos (LLA), con los siguientes antibióticos: penicilina (P), estreptomícina (E), tetraciclina (T), cloranfenicol (C) y novobiocina (N), en forma simple, binaria (combinación de 2 antibióticos) y terciaria (combinación de 3 antibióticos), las cuales se presentan en el cuadro No. 1. La concentración de cada antibiótico se presenta en el cuadro No. 2.

Cada una de las leches experimentalmente contaminadas con antibióticos mencionadas en el cuadro No. 1, fueron sometidas a la determinación específica para cada antibiótico, utilizando la técnica microbiológica de difusión de cilindro en placa, establecidas por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica (20).

A continuación se describen las técnicas microbiológicas para cada uno de los antibióticos y la forma de preparar el inóculo correspondiente:

1.1. Penicilina: Para la detección de residuos de penicilina se preparó, medio especial para antibióticos No. 1 de Grove y Randall, se esterilizó y se pasó a un baño María a 50°C, manteniéndolo a esa temperatura; se agregó 1 ml de suspensión estandarizada de Sarcina lutea No. 9314 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), por cada 100 ml de medio y se homogeneizó. A cada

una de tres cajas de Petri de 100 x 20 mm, empleadas por cada muestra de leche, se le pusieron 10 ml de medio de cultivo homogeneizado; se dejó solidificar el medio por 10-15 minutos, después se colocaron 6 cilindros de acero inoxidable de 6 mm de diámetro equidistantes entre sí. En tres cilindros alternos se colocaron 250 mc1 de solución media de referencia (0.05 U.I. de penicilina/ml) y en los otros tres restantes la muestra de leche, con su correspondiente concentración, en el análisis simple, combinación binaria o combinación terciaria, se incubó a 30°C durante 18 horas.

Para la preparación del inóculo de Sarcina lutea se empleó un cultivo de 24 h en tubo inclinado con medio de cultivo especial para antibióticos No. 1 de Grove y Randall, se resembró en una botella de Roux con 250 ml del mismo medio y se cultivó por 24 h a 30°C. Se cosechó con 50 ml de solución salina estéril (SSE) y se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 50 ml de SSE (solución madre de bacterias).

1.2. Para la detección de residuos de estreptomycin se siguió el mismo procedimiento con los siguientes cambios:

- a) Suspensión de esporas de Bacillus subtilis (ATCC-6633).
- b) Medio especial para antibióticos No. 34 de Grove y Randall.
- c) 0.3 ml de suspensión madre de esporas por cada 100 ml de medio.
- d) Solución media de referencia 0.5 mcg de estreptomycin/ml.
- e) pH de la leche para la prueba 8.0.
- f) Temperatura: 37°C.

Para la preparación del inóculo de esporas de Bacillus subtilis, se empleó un cultivo de 24 h en tubo inclinado con medio de cultivo especial para antibióticos No. 1 de Grove y Randall, se re

sembró en una botella de Roux con 250 ml del mismo medio y se cultivó durante 5 días a 37°C. Se cosechó con 50 ml de SSE, poniéndose en un baño María a 70°C durante media hora. Se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 50 ml de SSE, (suspensión madre de esporas), la concentración de esporas se determinó siguiendo un criterio de concentración.

1.3. Para la detección de residuos de tetraciclina se siguió el mismo procedimiento, con las siguientes modificaciones:

- a) Suspensión de esporas de Bacillus cereus variedad mycoides - (ATCC-11775).
- b) Medio especial para antibióticos No. 3 de Grove y Randall.
- c) 0.25 ml de suspensión madre de esporas por cada 100 ml de medio.
- d) Solución media de referencia 0.2 mcg de tetraciclina/ml.
- e) pH de la leche para la prueba 5.0.

Para la preparación del inóculo de esporas de Bacillus cereus var. mycoides, se empleó un cultivo de 24 h en tubo inclinado con medio de cultivo especial para antibióticos No. 1 de Grove y Randall, se sembró en una botella de Roux con 250 ml del mismo medio y se cultivó durante 5 días a 30°C. Se cosechó con 50 ml de SSE, poniéndose en un baño María a 70°C, durante media hora. Se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 50 ml de SSE (suspensión madre de esporas), la concentración de esporas se determinó siguiendo un criterio de concentración.

1.4. Para la detección de residuos de cloranfenicol se siguió el mismo procedimiento, con los siguientes cambios:

- a) Suspensión estandarizada de Sarcina lutea (ATCC-9314).

- b) Medio especial para antibióticos No. 1 de Grove y Randall.
- c) 2 ml de suspensión estandarizada por cada 100 ml de medio.
- d) Solución media de referencia 12.5 mcg de cloranfenicol/ml.

El inóculo se preparó igual al que se utilizó para detectar residuos de penicilina.

1.5. Para la detección de residuos de novobiocina se siguió el mismo procedimiento con los siguientes cambios:

- a) Suspensión estandarizada de Staphylococcus epidermidis (ATCC-12228).
- b) Medio especial para antibióticos No. 1 de Grove y Randall.
- c) 1 ml de suspensión estandarizada por cada 100 ml de medio.
- d) Solución media de referencia 0.5 mcg de novobiocina/ml.

Para la preparación del inóculo de Staphylococcus epidermidis, se empleó un cultivo de 24 h en tubo inclinado con medio de cultivo especial para antibióticos No. 1 de Grove y Randall, se sembró en una botella de Roux con 250 ml del mismo medio y se cultivó por 24 h a 30°C. Se cosechó con 50 ml de SSE y se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 50 ml de SSE (solución madre de bacterias).

Se estimó la sensibilidad y la especificidad de la técnica microbiológica de difusión de cilindro en placa para cloranfenicol y novobiocina, considerando: Sensibilidad como la probabilidad de que la prueba sea positiva, cuando la muestra realmente tiene antibiótico,  $P(+/A)$  (probabilidad P, de que la prueba sea positiva +, dado /, que tiene antibiótico A), ecuación No. 1. Especificidad como la probabilidad de que la prueba sea negativa, cuando la muestra realmente no tiene antibiótico,  $P(-/\bar{A})$  (proba

bilidad P, de que la prueba sea negativa -, dado /, que no contiene antibiótico), ecuación No. 2.

Ecuación No. 1:

$$P(+/A) = \frac{a}{a + c}$$

en donde:

a) Muestras verdaderas positivas.

c) Muestras falsas negativas.

Ecuación No. 2:

$$P(-/A) = \frac{d}{b + d}$$

b) Muestras falsas positivas.

d) Muestras verdaderas negativas.

Se estimó el valor de predicción de una prueba positiva (ecuación No. 3) y el valor de predicción de una prueba negativa (ecuación No. 4) considerando: El valor de predicción de una prueba positiva como la probabilidad de que una muestra realmente tenga antibiótico en una prueba positiva P(A/+) (probabilidad P, de que la muestra tenga antibiótico A, dado /, que es positiva +); y el valor de predicción de una prueba negativa como la probabilidad de que una muestra realmente no tenga antibiótico en una prueba negativa P( $\bar{A}$ /-) (probabilidad P, de que la muestra no tenga antibiótico A, dado /, que es negativa -). (25)

Ecuación No. 3:

$$P(A/+) = \frac{a}{a + b}$$

Ecuación No. 4:

$$P(\bar{A}/-) = \frac{d}{c + d}$$

II. Para la realización del objetivo No. 2, se contaminó leche libre de antibióticos, con los siguientes antibióticos: penicilina (P), estreptomycin (E), tetraciclina (T), cloranfenicol (C) y novobiocina (N). En forma simple, combinaciones binarias y combinaciones terciarias, las cuales se presentan en el cuadro No. 1. Cada una de



las leches contaminadas y mencionadas en el cuadro No. 1 se sometieron a la extracción de los antibióticos de la siguiente manera:

En un embudo de separación se colocaron 5 ml de la muestra de leche contaminada, con 30 ml de acetnitrilo, se homogeneizó y se trató con 10 ml de hexano, se homogeneizó. En otro embudo de separación se colocó la fase inferior que contenía acetnitrilo-agua. En la fase superior quedaron lípidos. Se repitió el tratamiento con 10 ml de hexano; se recogió la fase inferior y se llevó a un matraz de bola con boca esmerilada 24/40. Se acopló a un aparato rotatorio de destilación al vacío y se destiló a 55°C y 15 libras/pulgada<sup>2</sup> de vacío hasta sequedad. Se recuperó el antibiótico en 2.5 ml de metanol y se llevó a un tubo con tapón de rosca. De este extracto se separó por la técnica de cromatografía en capa delgada para cloranfenicol si estaba presente, o la novobiocina en su caso; cada uno por su respectivo método.

Se prepararon cromatoplasmas de Sílica gel G, de la siguiente manera; en un mortero se colocaron 30 g de Sílica gel G (tipo 60) Merck y se homogeneizó con 60 ml de agua destilada. Se colocó la mezcla en el aplicador calibrado a un grosor de 0.5 mm y se extendió en placas de vidrio de 20 x 20 cm limpias y desengrasadas. Después de la aplicación se dejaron secar a temperatura ambiente por 30 minutos, luego se colocaron en una estufa a 100°C por una hora.

Una vez obtenido el extracto de la muestra y estar preparadas las cromatoplasmas de Sílica gel G, se aplicó la técnica de la siguiente manera:

2.1. Para la detección de residuos de cloranfenicol se utilizó una cromatoplasma, de 20 x 20 cm con Sílica gel G (tipo 60) Merck.

El estándar de cloranfenicol cuya concentración fue de 1 mcg/ml y el extracto de la muestra se colocaron a 15 mm del borde infe

rior y se identificaron en el borde superior. Se colocaron en cromatoplaaca 1 y 5 mcl del estándar de cloranfenicol alternados con 1 y 5 mcl del extracto de la leche contaminada. Se llevó la cromatoplaaca a la cámara de cromatografía que contenía 10 volúmenes de cloroformo, saturados con 2 volúmenes de una mezcla 1:1 de metanol y ácido fórmico al 2% en agua destilada; se dejó en la cámara hasta que el solvente hubo ascendido 10 cm. Una vez que recorrió la distancia se sacó de la cámara y se dejó secar a temperatura ambiente. Se roció con una solución reveladora compuesta por 3 ml de cloruro estanoso al 15% en ácido clorhídrico concentrado, más 15 ml de ácido clorhídrico concentrado y 180 ml de agua destilada; se dejó secar a temperatura ambiente y después se roció con otra solución reveladora formada por 5 ml de p-dimetilbenzaldehído al 10% en ácido clorhídrico concentrado, más 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y 20 ml de acetona. Se dejó secar a temperatura ambiente. El  $R_f$  es de 9 y las manchas se ven de color amarillo.

2.2. Para la detección de residuos de novobiocina se utilizó un cromatofolio Merc PL de Sílica Gel 60 F<sub>254</sub> de 20 x 20 cm. El estándar de novobiocina cuya concentración fue de 1 mcg/ml y el extracto de la muestra se colocaron a 15 mm del borde inferior y se identificaron en el borde superior. Se colocaron en el cromatofolio 1 y 5 mcl del estándar de novobiocina, alternados con 1 y 5 mcl del extracto de la leche contaminada. Se llevó el cromatofolio a la cámara de cromatografía que contenía una solución de etanol - amoniaco concentrado - agua destilada (8:1:1); se dejó en la cámara hasta que el solvente ascendió 10 cm. Una vez que el solvente recorrió la distancia se sacó de la cámara y se dejó secar en una campana extractora a temperatura ambiente. Una vez seco el cromatofolio se interpretó con -

luz U.V. de 254 nm. El  $hR_f$  es de 0.2 y las manchas son oscuras en fondo verdoso.

III. Para la realización del objetivo No. 3, se analizaron 200 muestras de leche de marcas comerciales, disponibles en el Distrito Federal y su área metropolitana. Las muestras fueron colectadas al azar, en frascos limpios de vidrio o plástico y se conservaron en refrigeración hasta el momento del análisis al día siguiente de su obtención. Las muestras fueron colectadas de casas particulares, expendios y establecimientos comerciales, registrándose los siguientes datos: nombre y presentación comercial, fecha de envasado, zona y fecha de recolección.

Se utilizó la técnica microbiológica rápida con Bacillus stearothermophilus, con una temperatura de incubación de 65°C durante 3½ horas (44).

IV. Para la realización del objetivo No. 4, se analizaron aquellas muestras de leche del objetivo No. 3 que resultaron positivas a antibióticos mediante la técnica microbiológica rápida, fueron sometidas a la identificación de cloranfenicol y novobiocina, a través de la técnica más específica para dicho fin.

La concentración de cloranfenicol o novobiocina se determinó por medio de la técnica microbiológica de difusión de cilindro en placa.

Se estimó la ecuación de regresión; y la correlación existente entre el halo de inhibición en mm y la concentración del antibiótico, para cloranfenicol y novobiocina.

Para poder establecer la ecuación de regresión correspondiente se desarrolló una curva estándar de 5 puntos para cloranfenicol y novobiocina, en el cuadro No. 3 se presentan las concentraciones empleadas en la curva estándar.

Se realizó una prueba de hipótesis para determinar si los valores de  $x$  eran iguales a cero ( $H_0: X=0$ ).

## RESULTADOS.

En el cuadro No. 4 se presentan los halos de inhibición en mm en cada prueba microbiológica específica con leches contaminadas con un solo antibiótico, por muestra, para el objetivo No. 1, en donde se observa que la prueba de cloranfenicol registró halos de inhibición aún cuando éste no se encontraba presente; en la prueba de novobiocina de los antibióticos empleados con excepción de uno, todos se registraron.

El cuadro No. 5 se presentan los halos de inhibición en mm en cada prueba microbiológica específica con leches contaminadas con dos antibióticos (combinación binaria), por muestra, para el objetivo No. 1.

En el cuadro No. 6 se presentan los halos de inhibición en mm en cada prueba microbiológica específica con leches contaminadas con tres antibióticos (combinación terciaria), por muestra, para el objetivo No. 1.

Se observó que la prueba microbiológica para cloranfenicol y para novobiocina, tanto en las combinaciones binarias como en las combinaciones terciarias, se encontraron halos de inhibición aún cuando no estaban presentes dichos antibióticos.

Con base en el cuadro No. 7 se estimó la sensibilidad, especificidad, valor de predicción de una prueba positiva y el valor de predicción de una prueba negativa, para la prueba microbiológica de difusión de cilindro en placa para cloranfenicol y para novobiocina, con leches contaminadas con uno, dos y tres antibióticos; empleando las ecuaciones Nos. 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

En el cuadro No. 8 se presentan las estimaciones obtenidas para la sensibilidad, especificidad, valor de predicción de una prueba positiva y valor de predicción de una prueba negativa, para la prueba microbiológica de cloranfenicol y novobiocina, con leches contaminadas con uno, dos y tres antibióticos.

Se observó que existe una alta sensibilidad y una nula especificidad, con excepción del análisis simple para novobiocina que es baja.

El valor de predicción de una prueba positiva es bajo en leches contaminadas con 1, 2 y 3 antibióticos; el valor de predicción de una prueba negativa es nulo en cualquiera de los casos, excepto en el análisis simple para novobiocina que es bajo.

En el cuadro No. 9 se presentan las observaciones de la técnica de cromatografía en capa delgada para cloranfenicol y novobiocina con un solo antibiótico, combinaciones binarias y combinaciones terciarias, para el objetivo No. 2.

Con base en el cuadro No. 10 se estimó la sensibilidad, especificidad, valor de predicción de una prueba positiva y valor de predicción de una prueba negativa, para la técnica de cromatografía en capa delgada para cloranfenicol y novobiocina, con leches contaminadas con 1, 2 y 3 antibióticos; empleando las ecuaciones Nos. 1, 2, 3 y 4 para el objetivo No. 1.

En el cuadro No. 11 se presentan las estimaciones obtenidas para la sensibilidad, especificidad, valor de predicción de una prueba positiva y valor de predicción de una prueba negativa, con leches contaminadas con 1, 2 y 3 antibióticos. En donde se observó que la técnica de cromatografía en capa delgada para cloranfenicol y para novobiocina es altamente específica.

En el cuadro No. 12 se observan los nombres, presentación comercial y porcentaje de muestras de leche analizadas en el objetivo No. 3. De las 200 muestras se detectaron 110 muestras positivas (55%) y 90 muestras libres de antibióticos (45%).

Para la realización del objetivo No. 4 se utilizó la técnica de cromatografía en capa delgada para cloranfenicol y novobiocina, por su alta

especificidad.

Se analizaron 110 muestras positivas a antibióticos (55%), 6 muestras contenían residuos de cloranfenicol (3%); 2 muestras contenían residuos de novobiocina (1%) y para el resto de las pruebas positivas (51%) contenían antibióticos o inhibidores bacterianos diferentes a cloranfenicol o novobiocina, los cuales no se determinaron.

Se empleó la técnica microbiológica de difusión de cilindro en placa, para determinar la cantidad de antibiótico presente en las muestras verdaderas positivas a cloranfenicol y la novobiocina, por su alta sensibilidad.

Se desarrolló una curva estándar para cloranfenicol y novobiocina; con los resultados obtenidos se calcularon las ecuaciones de regresión correspondientes, las cuales se presentan en el cuadro No. 13; y el valor de correlación estimado para cloranfenicol fue de 0.92 y para novobiocina fue de 0.89.

Además se determinó si los valores de  $x = 0$ , se estimó una F calculada ( $F_c$ ) para cloranfenicol de 16.77 y una F de tablas ( $F_t$ ) con 1,3 grados de libertad y una  $P (<.05)$  de 10.13; para novobiocina la  $F_c$  fue de 12.29 y la  $F_t$  con 1,3 grados de libertad y una  $P (<.05)$  de 10.13 (9).

Las estimaciones de la concentración de cloranfenicol y novobiocina se presentan en el cuadro No. 14, empleando la ecuación correspondiente.

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

Se observó que la técnica microbiológica de difusión de cilindro en placa demostró falta de especificidad, ya que presentaba halos de inhibición aún cuando no estaban presentes los antibióticos de referencia.

La presencia de estos halos se deben a que algunos antibióticos actúan en el mismo sitio del microorganismos, como sucede con la estreptomycinina, las tetraciclinas y el cloranfenicol que actúan inhibiendo la síntesis protéica.

La técnica de cromatografía en capa delgada mostró una alta especificidad, resultado que concuerda con Allen (1985), Betina (1972) y Mooaths (1985).

Se determinó un 55% de muestras contaminadas con residuos de antibióticos los cuales están relacionados con los trabajos de Velázquez (1980) y Cruz (1985) que reportaron un 100% y un 91.4% respectivamente de muestras contaminadas con residuos de penicilina, estreptomycinina y tetraciclina.

La disminución en el porcentaje de contaminación posiblemente esté relacionada con la época del muestreo, ya que existen enfermedades de tipo estacional dentro de las explotaciones lecheras, como sucede en la época de lluvias en donde la incidencia de mastitis aumenta o un adecuado manejo sanitario acompañado de un buen programa en el control de enfermedades dentro de la explotación o a un adecuado uso de los medicamentos en el tratamiento de algún tipo de padecimiento apoyado en un correcto diagnóstico.

La técnica microbiológica de difusión de cilindro en placa para cloranfenicol y novobiocina es altamente sensible, por lo que se recomienda emplearla para cuantificar la concentración de antibiótico presente en la leche pasteurizada, siempre y cuando se conozca el antibiótico pre-



sente y éste no se encuentre combinado con otro antibiótico, pues la técnica carece de especificidad.

Mendez y col. (1984) describen que el valor de correlación tiene un rango de  $-1$  a  $1$ , y entre más cercano esté el valor a  $1$  mejor será la correlación. Se estimó una correlación de  $0.92$  para cloranfenicol y de  $0.89$  para novobiocina, lo que demuestra que existe un alto valor de correlación entre el halo de inhibición en mm ( $x$ ) y la concentración del antibiótico ( $y$ ).

Se comprobó si los valores de  $x = 0$ . Se estimó una  $F_c$  para cloranfenicol de  $16.77$  y una  $F_t$  de  $10.13$ ; para novobiocina la  $F_c$  fue de  $12.29$  y la  $F_t$  de  $10.13$ , por lo tanto los valores de  $x$  para cloranfenicol y novobiocina son  $\neq 0$ .

A pesar de que el Reglamento para el control sanitario de la leche, especifica que la leche y sus derivados destinados al consumo humano deben de estar libres de antibióticos, se encontró un elevado porcentaje de contaminación con residuos de antibióticos en la leche pasteurizada que se consume en el Distrito Federal y su área metropolitana, lo que representa un serio peligro para la salud pública, por el riesgo que implican estas drogas.

## CONCLUSIONES.

La técnica microbiológica de difusión de cilindro en placa, demostró tener una baja especificidad para detectar residuos de cloranfenicol y novobiocina, en leche pasteurizada, por lo que no se recomienda emplear la para dicho fin. Esta técnica es altamente sensible por lo que se puede aplicar únicamente para cuantificar residuos en leche pasteurizada en donde se sabe el tipo de antibiótico presente, siempre y cuando no esté en combinación con otros.

La técnica de cromatografía en capa delgada, demostró ser altamente específica y sensible, para detectar residuos de cloranfenicol y novobiocina, en leche pasteurizada, por lo que es un procedimiento recomendable para identificar estos antibióticos en leche pasteurizada.

Se encontró un 55% de contaminación con residuos de inhibidores bacterianos, en leche pasteurizada que se consume en el Distrito Federal y su área metropolitana.

Se empleó la técnica de cromatografía en capa delgada y se encontró un 3% de muestras contaminadas con residuos de cloranfenicol y 1% con residuos de novobiocina.

Se utilizó la técnica microbiológica de difusión de cilindro en placa para cuantificar la concentración de residuos y se estimó para cloranfenicol una concentración mínima de 0.3289 mcg/ml y máxima de 1.4030 mcg/ml; para novobiocina la concentración mínima fue de 0.1719 mcg/ml y máxima 0.3898 mcg/ml.

Aunque el porcentaje de muestras positivas a los antibióticos estudiados es bajo, esta situación no deja de representar un serio peligro para la salud pública, ya que la peligrosidad de estas drogas y las concentraciones detectadas así lo indican.

Cuadro No. 1

COMBINACIONES DE ANTIBIOTICOS ADICIONADOS A LECHE LIBRE DE ANTIBIOTICOS PARA ESTABLECER LA ESPECIFICIDAD DE LAS TECNICAS: MICROBIOLOGICA DE DIFUSION DE CILINDRO EN PLACA Y CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

Análisis simple	Combinación binaria	Combinación terciaria
Penicilina (P)	P-E	P-E-T
Estreptomicina (E)	P-T	P-E-C
Tetraciclina (T)	P-C	P-E-N
Clorenfenicol (C)	P-N	P-T-C
Novobiocina (N)	E-T	P-T-N
	E-C	P-C-N
	E-N	E-T-C
	T-C	E-T-N
	T-N	E-C-N
	C-N	T-C-N

Cuadro No. 2

CONCENTRACION DE CADA UNO DE LOS ANTIBIOTICOS, UTILIZADOS EN LOS EXPERIMENTOS Nos. 1 y 2.

Antibiótico	Concentración/ml
Penicilina	0.05 U. I.
Estreptomina	0.5 mcg
Tetraciclina	0.2 mcg
Cloranfenicol	12.5 mcg
Novobiocina	0.5 mcg

Quadro No. 3

CONCENTRACIONES EMPLEADAS EN CADA ANTIBIOTICO PARA DESARROLLAR LA CURVA PATRON. (1)

Cloranfenicol mcg/ml	Novobiocina mcg/ml
50	2
25	1
12.5*	0.5*
6.25	0.25
3.125	0.125
1.5625**	0.0625**

(1) cada concentración se repitió 27 veces.

\* concentración media de referencia.

\*\* la concentración más baja generalmente es negativa.

Cuadro No. 4

HALOS DE INHIBICION OBTENIDOS EN CADA PRUEBA MICROBIOLOGICA ESPECIFICA, CON LECHEs CONTAMINADAS CON UN SOLO ANTIBIOTICO POR LECHE, PARA EL OBJETIVO No. 1

Antibiótico	P R U E B A *														
	PENICILINA			ESTREPTOMICINA			TETRACICLINA			CLORAMFENICOL			NOVOBIOCINA		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Penicilina	---	---	---	12.0	12.1	8.8	16.7	9.0	8.8	15.1	9.5	8.8	16.0	8.8	8.8
Estreptomina	15.5	9.3	8.8	---	---	---	16.6	9.0	8.8	15.0	9.2	8.8	16.0	10.7	8.8
Tetraciclina	15.2	8.8	8.8	12.1	12.4	8.8	---	---	---	15.0	9.5	8.8	16.0	9.4	8.8
Cloranfenicol	15.3	16.1	8.8	12.0	11.5	8.8	16.5	15.7	8.8	---	---	---	16.0	15.0	8.8
Novobiocina	15.2	9.5	8.8	12.0	17.3	8.8	16.6	9.6	8.8	15.0	9.1	8.8	---	---	---

\* prueba microbiológica específica para cada antibiótico (3 repeticiones por leche contaminada).

1 Media de los halos de inhibición en mm del estándar del antibiótico de la prueba.

2 Media de los halos de inhibición en mm del estándar del antibiótico a probar.

3 Media de los halos de no desarrollo en mm de leche libre de antibióticos.

Cuadro No. 5

HALOS DE INHIBICION OBTENIDOS EN CADA PRUEBA MICROBIOLÓGICA ESPECIFICA, CON LECHES CONTAMINADAS CON DOS ANTIBIÓTICOS POR LECHE, PARA EL OBJETIVO No. 1.

Combinación binaria	P R U E B A *														
	PENICILINA			ESTREPTOMICINA			TETRACICLINA			CLORANFENICOL			NOVOBIOCINA		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
P-E	13.2	12.8	8.8	13.4	12.8	8.8	16.5	19.4	8.8	15.2	11.7	8.8	16.3	10.5	8.8
P-T	13.2	12.4	8.8	13.6	11.4	8.8	16.3	19.0	8.8	15.5	11.5	8.8	16.7	10.2	8.8
P-C	13.1	14.5	8.8	13.6	15.9	8.8	16.5	22.2	8.8	15.2	15.9	8.8	16.5	14.5	8.8
P-N	13.1	12.9	8.8	13.4	12.8	8.8	16.3	19.8	8.8	15.3	14.1	8.8	16.2	16.5	8.8
E-T	13.3	11.2	8.8	13.7	12.4	8.8	16.7	16.0	8.8	15.5	10.4	8.8	16.3	10.0	8.8
E-C	13.1	15.5	8.8	13.6	15.5	8.8	16.3	10.3	8.8	15.3	14.9	8.8	16.6	12.1	8.8
E-N	13.1	15.5	8.8	13.5	13.0	8.8	16.4	20.3	8.8	15.3	11.5	8.8	16.6	16.1	8.8
T-C	13.1	15.0	8.8	13.7	16.3	8.8	16.9	20.3	8.8	15.3	14.8	8.8	16.3	12.1	8.8
T-N	13.2	15.1	8.8	13.6	11.2	8.8	16.5	20.4	8.8	15.2	10.3	8.8	16.3	16.6	8.8
C-N	13.1	15.1	8.8	13.6	16.2	8.8	16.6	19.8	8.8	15.1	15.9	8.8	16.3	16.0	8.8

\* prueba microbiológica específica para cada combinación binaria (3 repeticiones por leche contaminada).

1 Media de los halos de inhibición en mm del estándar del antibiótico de la prueba.

2 Media de los halos de inhibición en mm de los estándares de la combinación binaria.

3 Media de las zonas de no desarrollo en mm de leche libre de antibióticos.

Cuadro No. 6

HALOS DE INHIBICION OBTENIDOS EN CADA PRUEBA MICROBIOLOGICA ESPECIFICA, CON LECHE CONTAMINADAS  
CON TRES ANTIBIOTICOS POR LECHE, PARA EL OBJETIVO No. 1

Combinación terciaria	P R U E B A*														
	Penicilina			Estreptomicina			Tetraciclina			Cloranfenicol			Novobiocina		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
P-E-T	13.2	13.0	8.8	13.3	12.8	8.8	16.5	18.4	8.8	15.3	15.2	8.8	16.6	17.2	8.8
P-E-C	13.3	12.9	8.8	13.5	14.7	8.8	16.5	20.3	8.8	15.6	18.1	8.8	16.6	13.1	8.8
P-E-N	13.3	13.0	8.8	13.4	14.9	8.8	16.4	18.4	8.8	15.2	14.9	8.8	16.5	17.2	8.8
P-T-C	13.5	14.0	8.8	13.6	15.9	8.8	16.5	20.9	8.8	15.4	14.7	8.8	16.6	13.2	8.8
P-T-N	13.4	14.5	8.8	13.5	15.5	8.8	16.4	20.1	8.8	15.6	14.2	8.8	16.4	18.6	8.8
P-C-N	13.2	13.1	8.8	13.7	14.9	8.8	16.6	18.3	8.8	15.5	14.8	8.8	16.6	19.4	8.8
E-T-C	13.3	11.5	8.8	13.4	15.2	8.8	16.3	18.8	8.8	15.3	15.0	8.8	16.6	14.3	8.8
E-T-N	13.3	10.8	8.8	13.4	12.9	8.8	16.5	16.0	8.8	15.4	14.7	8.8	16.6	16.2	8.8
E-C-N	13.4	12.5	8.8	13.3	14.9	8.8	16.3	18.3	8.8	15.6	14.9	8.8	16.7	19.2	8.8
T-C-N	13.3	11.3	8.8	13.7	14.0	8.8	16.4	16.6	8.8	15.4	14.4	8.8	16.7	21.2	8.8

\* prueba microbiológica específica para cada combinación terciaria (3 repeticiones por leche contaminada).

1 Media de los halos de inhibición en mm del estándar del antibiótico de la prueba.

2 Media de los halos de inhibición en mm de los estándares de la combinación terciaria.

3 Media de las zonas de no desarrollo en mm de leche libre de antibióticos.



Cuadro No. 7

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA TECNICA MICROBIOLÓGICA DE DIFUSION DE CILINDRO EN PLACA PARA CLORANFENICOL Y NOVOBIOCINA, CON LECHE CONTAMINADAS PARA EL OBJE TIVO No. 1.

Muestras	ANÁLISIS SIMPLE		COMBINACION BINARIA		COMBINACION TERCIARIA	
	Clor.	Novo.	Clor.	Novo.	Clor.	Novo.
	Verdaderas positivas	1	1	4	4	6
Falsas positivas	4	3	6	6	4	4
Falsas negativas	0	0	0	0	0	0
Verdaderas negativas	0	1	0	0	0	0.

Cuadro No. 8.

ESTIMACIONES OBTENIDAS PARA LA SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR DE PREDICCIÓN DE UNA PRUEBA POSITIVA Y EL VALOR DE PREDICCIÓN DE UNA PRUEBA NEGATIVA, DE LA TÉCNICA MICROBIOLÓGICA DE DIFUSIÓN DE CILINDRO EN PLACA PARA CLORANFENICOL Y NOVBIOCINA, CON LECHEs CONTAMINADAS PARA EL OBJETIVO No. 1.

Estimación	ANÁLISIS SIMPLE (%)		COMBINACION BINARIA (%)		COMBINACION TERCIARIA (%)	
	Clor.	Novo.	Clor.	Novo.	Clor.	Novo.
Sensibilidad	100	100	100	100	100	100
Especificidad	0	33	0	0	0	0
Valor de predicción de una prueba positiva	20	25	.40	.40	.60	.60
Valor de predicción de una prueba negativa	0	100	0	0	0	0

Cuadro No. 9.

DETECCION DE RESIDUOS DE CLORANFENICOL Y DE NOVIOBICINA, POR LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA, EMPLEANDO LAS COMBINACIONES PARA EL OBJETIVO No. 1.

ANALISIS SIMPLE	COMBINACION		COMBINACION		COMBINACION		COMBINACION	
	Clor.	Novo.	BINARIA	Clor.	Novo.	TERCIARIA	Clor.	Novo.
P	-	-	P-E	-	-	P-E-T	-	-
E	-	-	P-T	-	-	P-E-C	+	-
T	-	-	P-C	+	-	P-E-N	-	+
C	+	-	P-N	-	+	P-T-C	+	-
N	-	+	E-T	-	-	P-T-N	-	+
			E-C	+	-	P-C-N	+	+
			E-N	-	+	E-T-C	+	-
			T-C	+	-	E-T-N	-	+
			T-N	-	+	E-C-N	+	+
			C-N	+	+	T-C-N	+	+

Cuadro No. 10.

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA PARA CLO-  
RANFENICOL Y NOVOBIOCINA, CON LECHES CONTAMINADAS PARA EL OBJETIVO No. 2.

Muestras	ANALISIS SIMPLE		COMBINACION BINARIA		COMBINACION TERCIARIA	
	Clor.	Novo.	Clor.	Novo.	Clor.	Novo.
	Verdaderas positivas	1	1	4	4	6
Falsas positivas	0	0	0	0	0	0
Falsas negativas	0	0	0	0	0	0
Verdaderas negativas	4	4	6	6	4	4

Cuadro No. 11

ESTIMACIONES OBTENIDAS PARA LA SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR DE PREDICCIÓN DE UNA PRUEBA POSITIVA Y EL VALOR DE PREDICCIÓN DE UNA PRUEBA NEGATIVA, DE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA PARA CLORANFENICOL Y PARA NO VOBIOCINA, CON LECHEs CONTAMINADAS PARA EL OBJETIVO No. 2.

Estimación	ANÁLISIS		COMBINACION		COMBINACION	
	SIMPLE (%)		BINARIA (%)		TERCIARIA (%)	
	Clor.	Novo.	Clor.	Novo.	Clor.	Novo.
Sensibilidad	100	100	100	100	100	100
Especificidad	100	100	100	100	100	100
Valor de predicción de una prueba positiva	100	100	100	100	100	100
Valor de predicción de una prueba negativa	100	100	100	100	100	100

Cuadro No. 12

NOMBRE, PRESENTACION COMERCIAL, NO. DE MUESTRAS POR MARCA Y SU CORRESPONDIENTE PORCENTAJE, EN MUESTRAS DE LECHE EMPLEADAS EN EL OBJETIVO - No. 3.

Nombre Comercial y presentación*	No. de muestras	Porcentaje (%)
Lala	29	14.5
Lala 2 litros	14	7.0
Lala semidescremada	9	4.5
Alpura	35	17.5
Alpura semidescremada	2	1.0
Alpura 2 000	5	2.5
Boreal	24	12.0
Liconsa 4 litros	27	13.5
Conasupo tetrapak	2	1.0
Rancho Santa Rosa	7	3.5
Rancho Moreda	16	8.0
Rancho El Rosario	13	6.5
O I F 200 ml	16	8.0
Rancho Santa Mónica	1	0.5
	<u>200</u>	<u>100.0</u>

\* En las marcas comerciales en donde no se especifica la presentación ésta corresponde a un litro.

Quadro No. 13

ECUACIONES DE REGRESION Y VALORES DE CORRELACION QUE EXISTEN ENTRE EL DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION EN mm DE CADA ANTIBIOTICO (x) Y LA CONCENTRACION DE LOS MISMOS (Y).  $Y = a + bx$ .

Antibiótico	Distancia al origen (a)	Regresión (b)	R <sup>2</sup>	R
Cloranfenicol	-34.75	3.58	0.84	0.92
Novobiocina	- 1.63	0.15	0.80	0.89

Cuadro No. 14

CONCENTRACION DE ANTIBIOTICOS ESTIMADO, EMPLEANDO LA ECUACION DE REGRESION PARA CLORANFENICOL O PARA NOVIOBIOCINA EN SU CASO.

Nombre comercial	Antibiótico	mcg/ml
Liconsa	Cloranfenicol	0.3289
Alpura	Cloranfenicol	1.4030
Rancho Moreda	Cloranfenicol	0.6869
Liconsa	Cloranfenicol	0.3289
Liconsa	Cloranfenicol	0.6869
Liconsa	Cloranfenicol	0.3289
Alpura	Novobiocina	0.1219
Alpura	Novobiocina	0.3898



BIBLIOGRAFIA CITADA.

1. AJA, C.R.: Palabras de bienvenida. Memorias de la Primera Conferencia Internacional sobre Ganado Lechero. CIGAL, México, D.F.: 1-3 - 1985.
2. ALLEN, E.D.: Review of chromatographic methods chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues from food, producing animals. J. Assoc. Anal. Chem. 68 (5): 990-999 (1985).
3. BETINA, V.: Antibiotics, en "Pharmaceutical applications of thin-layer and paper chromatography". Ed. Macek, K.: 501-535 1972.
4. BOOTH, N.H.: Drug and chemical residues in the edible tissues of animal, veterinary pharmacology and therapeutics. Ed. by: Meyer, J. L., Bootch, N.H., and Mc Donald, C.E. Iowa St. Univ. Press.: 1299-1341 1978.
5. BURROWS, G.E., BARTO, P.B., MARTIN, N., and TRIPP, M.L.: Comparative pharmacokinetics of antibiotics in newborn calves: chloramphenicol, lincomycin, and tylosin. Am. J. Vet. Res. 44 (6): 1053-1057 - (1983).
6. CARPENTER, P.L.: Microbiología, 4a. ed., Ed. Intamericana, México, D.F.: 198-210 1982.
7. Commissioner of the Food and Drug Administration Task Force Report on the Use of Antibiotics in Animal Feeds. Dep. of Health, Education and Welfare. Washington, D.C. 1968.
8. CRUZ, A.M.: Magnitud de la contaminación de leche comercial disponible en el Valle de México con estreptomocina, penicilina y tetraciclina. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, 1986.
9. DANIELS, W.W.: Bioestadística. 1a. ed., Ed. Limusa, México, D.F.: - 193-237, 243-289 1977.

10. EGAN, J., & O'CONNOR, F.: The persistence of comercial antibiotics preparations in mil following intrammary infusion. Irish. Vet. J. 35: 135-136 (1980).
11. FUENTES, H.V.: Farmacología y terapéutica veterinaria. 1a. ed., Ed Interamericana, México, D.F.: 108-110, 124 1985.
12. GILL, L.J.: Desing and analysis of experiments in the animal and - medical sciences. Iowa St. Univ. Press. 1010-1012 (1978).
13. GOTH, A.: Farmacología médica. 7a. ed., Ed. Interamericana, México, D.F.: 499-509 1975.
14. GOTUZZO, E.: Uso de antibióticos en gestantes. Rev. San. Minist. - Int. 40 (1):-95-101 (1979).
15. GOTTLIES, D. & SHAN, P.D.: Antibiotics I: Mechanism of action. — Springer-Verlang, New York Inc. 1967.
16. GUEST, G.B.: Status of FDA'S. Program on the use of antibiotics in animal feeds. J. Animal Sci. 42: 1052-1057 (1976).
17. JAWETZ, E., MELNICK, J.L. y ADEBERG, E.E.: Manual de microbiología médica. 9a. ed., Ed. El Manual Moderno, México, D.F.: 171-175 1981.
18. JOHNSON, M.E., MARTIN, J. H., BAKER, R.J., & PARSON, J.E.: Persis— tence of antibiotics in milk from cows treated late dry period. J. Dairy Sci. 60: 1655-1661 (1977).
19. KISER, J.S.: A Perspective on the use of antibiotics in animal feeds. J. Anim. Sci. 42: 1058-1072 (1976).
20. KRAMER, J., CARTER, G.C., & ARRET, B.: Antibiotic residues in milk, dairy products and animal tissues: methods, reports and protocols. Department. of Health and Welfare, Washington, D. C. (1968).
21. LAZZARO, D.A.: Reflexiones referentes a medicamentos, agentes quími cos o biológicos y alimentos. Gac. Vet. Buenos Aires, XLII (352): -

- 421-426 (1985).
22. LIVINGSTON, C.R.: Antibiotic residues in animal-derived food. J. Assoc Off Anal. Chem. 68 (5): 965-967 (1985).
  23. LITTER, M.: Farmacología experimental y clínica. 6a. ed., Ed. El Ateneo, Argentina: 1607-1622 1983.
  24. LÓPEZ, A.J.: Mecanismos bacterianos de resistencia a los agentes - quimioterapéuticos. Farmacología y Terapéutica Veterinaria, 1a. ed., Ed. Interamericana, México, D.F.: 72-75 1985.
  25. MENDEZ, R.I., NAMIHIRA, G.O., MORENO, A. L. y SOSA de M.C.: Protocolo de Investigación, lineamientos para su elaboración y análisis. - 1a. ed., Ed. Trillas, México, D.F.: 171-176 1984.
  26. MOATS, W.A.: Chromatographic methods for determination of macrolide antibiotics residues in mil of food-producing animals. J. Assoc. Off. Chem. 68 (5): 980-984 (1985).
  27. O'BRIEN, J.J., CAMPBELL, N., and CONAGHAN, T.: Effect of cooking and cold storage on biologically active antibiotics residues in meat. J. Hyg. Cam. 87: 511-523 (1981).
  28. OCAMPO, C.L., MUÑOZ, R.E. y VILLAGRAN, V.C.: Determinación de cortiosteroides en carne de bovino destinada al abasto. Rev. Vet., Universidad Nacional Autónoma de México, 9: 51-54 (1978).
  29. OTTH, R.C., TEJERO, P.A. y WILSON, S.G.: Aislamiento de dos cepas - de Salmonella thyphi resistentes al cloranfenicol. Bol. Inst. Bacte. Chile XX (1-2): 62-63 (1978).
  30. PEREZ, D.M.: Residuos de Fármacos y sus efectos en la salud pública. Memorias del curso Mastitis Bovina. División de Estudios de Posgrado. Fac. Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México: 67-74 1982.

31. PEREZ, D.M. y PAYAN, R.M.: La ganadería lechera en México y el mundo. INIP-SARH: 3 (1985).
32. POZO, L.R., HERRERA, M.A., POLO, V.L., LOPEZ, G.R. y JODRAL, V.M.: Investigación sobre la presencia de antibióticos en la región sur de España. Archivos de Zootecnia España 26 (102): 125-145 (1977)
33. RODRIGUEZ, C.R. / Vademécum académico de medicamentos. Fac. Med. - Universidad Nacional Autónoma de México: 171-173 1982.
34. SECRETARIA DE SALUBRIDAD Y ASISTENCIA: Farmacopea médica de los Estados Unidos Mexicanos. S.S.A., México, D.F.: 543, 1009 1974.
35. SECRETARIA DE SALUBRIDAD Y ASISTENCIA: Reglamento para el control sanitario de la leche. S.S.A., México, D.F.: 4-5, 17 1976.
36. SHIRLEY, A., WOOD, P.D., & PRETENICE, G.A.: Evaluation of the charm test; a rapid method for the detection of penicillin in milk. J. Dairy. Res. 50: 165-191 (1983).
37. SINGER, C.J., and KATZ, S.A.: Microbiological assay for chloramphenicol residues. J. Assoc. Off. Chem. 66 (5): 1073-1074 (1985).
38. TOPICOS SOBRE LA GLANDULA MAMARIA, Ed. Laboratorio de Investigaciones en Mastitis INIFAP-SARH 1 (3): 2 (1986).
39. TOPICOS SOBRE LA GLANDULA MAMARIA, Ed. Laboratorio de Investigaciones en Mastitis INIFAP-SARH 1 (8): 3 (1986).
40. VAN HUWELING, C.D.: The food drug and cosmetic act, animal drug, and the consumer. Ann. N. Y. Aca. 411-420 (1982).
41. VAZQUEZ, Y.C.: Contaminación de los alimentos. Naturaleza 11 (5): 271-274 (1980).
42. VELAZQUEZ, G.F., PEREZ, D.M. y GONZALEZ, R.: Investigación de residuos de antibióticos en leche pasteurizada y envasada que se consume en el área metropolitana. Sal. Púb. Méx. XXIII: 91-95 (1980).

43. VELAZQUEZ, G.F. y PEREZ, D.M.: Distribución de antibióticos agregados experimentalmente a la leche, en los derivados crema, queso, ca se ña y suero. Tec. Pec. Méx. 42: 61-64 (1982).
44. VELAZQUEZ, G.F. y PEREZ, D.M.: Evaluación del método microbiológico rápido para la determinación de residuos de antibióticos en la le che. Rev. Inv. Pec. Méx. 595-597 (1983).
45. YEARY, R.A.: Public health significance of chemical residues in food. J. Am. Vet. Assoc. 149: 145-152 (1960).