

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**Efecto de Concentraciones Mínimas de Antibióticos
Sobre el Desarrollo de Streptococcus thermophilus
y Lactobacillus bulgaricus en la Fabricación
del Yoghurt.**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

Rosa María Torres Cruz

DIRECTOR DE TESIS:

MVZ Carlos Pacheco Gallardo

A S E S O R :

Dr. MVZ Agustín Ramírez Alvarez

Zapopan, Jalisco; Agosto de 1995.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE CONCENTRACIONES MÍNIMAS DE
ANTIBIÓTICOS SOBRE EL DESARROLLO DE
Streptococcus thermophilus Y *Lactobacillus bulgaricus*
EN LA FABRICACIÓN DEL YOGHURT**

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER
EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA
PRESENTA LA PASANTE

ROSA MARÍA TORRES CRUZ

DIRECTOR DE TESIS
M.V.Z. CARLOS PACHECO GALLARDO

ASESOR DE TESIS
DR. MVZ. AGUSTÍN RAMÍREZ ALVAREZ

ZAPOPAN, JAL., AGOSTO 1995

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	X
INTRODUCCIÓN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	5
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS.....	7
MATERIAL Y MÉTODO.....	8
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA.....	45

RESUMEN

La presencia de residuos de antibióticos en la leche conduce a múltiples problemas de Salud Pública, por el potencias efecto tóxico y la hipersensibilidad en consumidores susceptibles. El proceso tecnológico de productos lácteos fermentados se ve mermado por afectar la calidad del producto produciendo pérdidas económicas. Se emplearon varias concentraciones de antimicrobianos usados en ganado lechero: Ampicilina (AMP), Polimixina (POL), Penicilina (PEN), Oxitetraciclina (OXI) y Dicloxacilina (DIC). Se inocularon con cultivo láctico (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* y se incubaron de 43 ° - 45° C por 2.5 hrs. Antes y después de la fermentación se midió el pH y acidez y posteriormente se evaluó la coagulación. Los resultados obtenidos fueron la inhibición bacteriana a partir de las siguientes concentraciones: AMP 0.005 µg./ml; PEN 0.05 UI/ml.; OXI 0.1 µg./ml.; DIC 0.3 µg./ml. Con POL no fue sensible a esta prueba. El método sencillo es susceptible para ser empleado en control de residuos de antibióticos que oficialmente no se lleva a cabo. Es importante en desarrollo de nuevas técnicas para la detección oportuna de residuos de medicamentos en leche.

INTRODUCCIÓN

El mal uso de los antibióticos conduce a múltiples problemas de Salud Pública, la introducción de determinados compuestos ha llevado a los investigadores a acelerar el proceso de adecuación de la quimioterapia a la siempre creciente resistencia bacteriana.

En un examen de recuento que publicó Veterinary Index revela que exista 191 preparaciones de drogas antimicrobianas para el control de infecciones en animales (1976) Similar estudio lo presentó Index Of Medical Specialities; haciendo mención que hay 213 preparaciones antimicrobianas para uso humano y un gran número de otras preparaciones farmacéuticas que no están incluidas en esta lista pero que son de importancia terapéutica en la Medicina Veterinaria, siendo base importante para el control de enfermedades de ganado lechero (mastitis, piometras, neumonías, etc.).

Los antibióticos más utilizados para lo antes mencionado son los siguientes:

AMPICILINA
POLIMIXINA
BENCIL PENICILINA
OXITETRACICLINA
DICLOXACILINA
ESTREPTOMICINA
TILOSINA (2, 4)

La ganadería lechera tiene un papel insustituible en la producción de alimentos de valor biológico para el hombre; la leche posee una amplia variabilidad en su composición, cambiando ésta durante el transcurso del ciclo de la lactación, fundamentalmente en sus fracciones proteica y salina influyendo también el estado sanitario del animal, y el régimen alimenticio a que se encuentra sometido. Existen varias razones por las cuales la leche es un alimento importante; por proporcionar elementos básicos para la dieta del humano. (11)

Una característica de la leche es su fácil contaminación debido a la presencia de agentes químicos como los antibióticos, los cuales de acuerdo a sus consecuencias deben ser considerados desde dos puntos de vista; la influencia que ejerce en la manufactura de alimentos lácteos fermentados (yoghurt, queso, etc.). Y la posibilidad de que los residuos antimicrobianos ejerzan efectos tóxicos en el consumidor, especialmente por la inducción de alergias y desarrollo de resistencia bacteriana. (1,2,8,16).

Es de gran importancia adquirir leche sin contaminantes por ser indispensables para la nutrición del humano, de lo contrario causa problemas de Salud Pública, así como trastornos en la economía de las empresas procesadoras de productos lácteos afectando la calidad del producto final, por ejemplo en la elaboración del yoghurt las bacterias como los *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* son esenciales para el desarrollo de acidez y coagulación del yoghurt, siendo éstos sensibles a mínimas cantidades de antimicrobianos alterando así su desarrollo y morfología. (8,13)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El empleo de fármacos en el tratamiento de enfermedades en animales criados para el consumo humano es tan antiguo como la práctica de la Medicina Veterinaria. Este uso se acompaña siempre del riesgo de que los residuos de dicha droga puedan encontrarse en alimentos de origen animal como huevos, leche, y tejidos animales utilizados en alimentación humana. Por lo tanto debe llevarse a cabo un control oficial estricto de residuos de contaminantes en dichos alimentos. La Administración de Medicamentos y Alimentos (F.D.A.), considera que para impedir los problemas por residuos farmacológicos en animales se debe considerar un tiempo de restricción establecido, de lo contrario puede producir la presencia de residuos farmacológicos ilegales. (18) Este efecto, produce en la industria procesadora de leche elevadas pérdidas económicas por el desarrollo de baja acidez, la falta o inhibición del proceso de fermentación afecta la manufactura de numerosos productos lácteos. (16) La fermentación láctica es importante por parte de las bacterias del yoghurt por producir ácido láctico, y pequeñas cantidades de productos secundarios, esencialmente compuestos carbonílicos, ácidos grasos volátiles y alcoholes. El ácido láctico contribuye al sabor fresco del yoghurt, en tanto los productos secundarios le proporcionan además de sabor, aroma característicos. (10)

Otro efecto del uso indiscriminado de los antimicrobianos en Medicina Veterinaria, es la facilidad con que muchos organismos bacterianos tienden a disminuir la susceptibilidad a los antibióticos que normalmente son indicados como control de patologías, retardando la mejoría del animal afectado. (1,18)

En México se hace poco caso del daño que puede causar el consumo diario de residuos de antibióticos en leche y sus derivados. Por lo tanto es importante la implementación de métodos sensibles para la detección de antimicrobianos o inhibidores en leche.

JUSTIFICACIÓN

El estado de Jalisco es uno de los principales productores de leche a nivel Nacional e indiscutiblemente ha ocupado por varios años el primer lugar en la producción lechera. Pero por falta de vigilancia de las autoridades correspondientes, se presenta con frecuencia leche contaminada por antibióticos, que es consumida por la población. (13)

El reglamento de la ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos y Servicios; en los artículos 32, 34, 37, 247, 248. (9) Establece las características que debe reunir la leche para su consumo, sin embargo la falta de métodos y/o acondicionamientos de laboratorios más accesibles en el Sector Oficial impiden la detección oportuna de antibióticos en leche. La presencia de inhibidores afecta la producción de derivados lácteos, y por lo tanto la economía de las empresas procesadoras.

Por lo que éste trabajo mostrará una opción mas para detectar antibióticos en leche y estudiar sobre la cantidad mínima inhibitoria que afecta la calidad del yoghurt.

HIPÓTESIS

Por la presencia de cantidades mínimas de antibióticos en leche, se inhibirá la actividad biológica de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, afectando la coagulación y acidez del yoghurt.



BIBLIOTECA CENTRAL

OBJETIVOS

GENERAL.

Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de cinco antibióticos sobre la actividad fermentativa de bacterias lácticas.

PARTICULAR

Validar la relación / concentración / respuesta de las siguientes sustancias de referencia:

AMPICILINA

POLIMIXINA

BENCIL PENICILINA SÓDICA

OXITETRACICLINA

DICLOXACILINA

MATERIAL Y MÉTODO

Se reconstituyó leche comercial en polvo libre de inhibidores (previo examen de detección de inhibidores de leche), la cual se contaminó con antibióticos estándar de referencia a diferentes concentraciones, realizándose c/u por triplicado (ver tabla 1). Se registró la acidez en grados Soxhlet Henkel (SH.) y medición del pH antes y después de la inoculación e incubación de la muestra y el testigo. La coagulación se observó después del proceso térmico.

TABLA 1

CONCENTRACIONES ANTIBIÓTICAS

ANTIBIÓTICO	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 5
AMPICILINA*	0.005	0.01	0.05	0.10	0.5
POLIMIXINA*	0.05	0.10	0.5	1.0	1.5
BENCIL PENICILINA SÓDICA**	0.002	0.005	0.01	0.05	0.1
OXITETRACICLINA*	0.1	0.3	0.5	0.8	1.0
DICLOXACILINA*	0.3	0.5	0.8	1.0	1.5
TESTIGO	LECHE LIBRE DE INHIBIDORES				

* mcg/ml

** U.I./ml

INOCULACIÓN.- Calentar la muestra contaminada y el testigo a 80°-90°C en baño María por 5 minutos, bajar la temperatura a 45°C para inocular con 0.5 ml. de yoghurt (cultivo madre) diluido al 50% (mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. 1:1), a no más de 24 horas de su elaboración. Se incubaron las muestras a 43°- 45°C en baño María 2.5 hrs. . Posteriormente se observaron resultados.

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE COAGULACIÓN: Se llevó a cabo mediante la observación directa de la muestra, comparándola con el testigo, registrando como sigue:

SIN COAGULACIÓN	(-)
CON GRUMOS	(+)
COAGULACIÓN COMPLETA	(++)

Se realizó frotis, tinción de Gram.

Se determinó pH con potenciómetro

DETERMINACIÓN DE ACIDEZ EN GRADOS SOXHLET HENKEL : A las muestras de 10 ml., se le agregaron 0.4 ml de Fenolftaleína alcohólica al 2% y se tituló con solución de Hidróxido de Sodio al 0.1 N. lentamente agitando breve y vigorosamente hasta que persistió una coloración rosa por 2 minutos.

El cálculo de los grados de acidez se obtuvieron dividiendo los mililitros de solución de Hidróxido de Sodio agregados entre 0.25. (12)

CRITERIO DE EVALUACIÓN: Se consideró positivo a sustancias inhibitorias cuando el incremento de acidez de la muestra sea menor que la mitad del incremento de acidez del testigo, así como la falta de coagulación y al observar cambios en la morfología y la relación coco:bacilo comparada con el testigo.

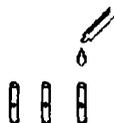
FLUJOGRAMA

Prueba de Yogurth

100 ml



Se reconstituyó
leche en polvo
al 10%



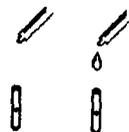
Contaminación
con antibiótico



Calentamiento
a 80-90 °C



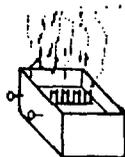
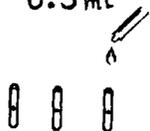
Enfriamiento a
43°C en baño maría



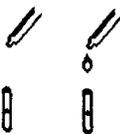
Toma de
acidez y pH
testigo y muestra

Incubación a 43-45°C
por 2-2½ hrs.

Inoculación con
yogurth al 50%
0.5 ml



Determinación
del grado de
coagulación



Toma de
acidez y pH
testigo y muestra

Frotis
de la
muestra



Observación
al microscopio

RESULTADOS

Las pruebas llevadas a cabo con los siguientes antibióticos: ampicilina, dicloxacilina polimixina, bencil penicilina sódica, oxitetraciclina, en la producción de yoghurt. Se observó que a cantidades mínimas de antibióticos utilizado en cada prueba hubo inhibición total o parcial de las bacterias termofílicas, por lo que no se produjo la coagulación y mostró una baja de acidez de las muestras, dada por la elevada sensibilidad de estas bacterias a los medicamentos.

En cada ensayo se observó un comportamiento de inhibición diferente de acuerdo al antibiótico empleado.

PRUEBA CON AMPICILINA

Se encontró una inhibición del desarrollo bacteriano termofílico así como la falta de coagulación, a partir de la concentración 0.005 microgramos por ml. en la leche, además se detectó una disminución de acidez (cuadro No. 1)

En comparación con el testigo todas las muestras resultaron positivas a la presencia del antibióticos mostrando de 0.0 a 6° SH de incrementó de acidez, siendo 24° SH la del testigo, por lo tanto el pH entre las muestras no hubo cambio significativo antes y después a la incubación. El testigo presentó un pH anterior a la incubación de 6.3 y posterior a la incubación de 3.90 con una muy buena coagulación la cual estuvo ausente en las muestras problema.

CUADRO No. 1

PRUEBA CON AMPICILINA

LECHE	*SH ANTES INCUBACIÓN	*SH POST INCUBACIÓN	*SH DE DIFERENCIA	RESULTADO	INTERPRETACIÓN DE COAGULACIÓN	pH ANTES INCUBACIÓN	pH POST INCUBACIÓN
TESTIGO	6	30	24	NEGATIVO	+++	6.31	3.90
TUBO 1 0.005	4	6	2	POSITIVO	-	6.39	6.47
TUBO 2 0.01	4	10	6	POSITIVO	-	6.37	6.51
TUBO 3 0.05	6	5.2	8	POSITIVO	-	6.37	6.59
TUBO 4 0.10	6	4	2	POSITIVO	-	6.36	6.59
TUBO 5 0.5	4	4	0	POSITIVO	-	6.37	6.55

L.STD = Leche estándar

- = No formó coagulación

SH = Grados Soxhlet-Henkel

++ = Con grumos

+++ = Buena coagulación

Para la observación del efecto inhibitor de la ampicilina sobre las bacterias lácticas del Yoghurt, se realizó un frotis de cada muestra demostrando lo siguiente:

LECHE TESTIGO : Libre de antibióticos

- HALLAZGOS**
- Buen desarrollo bacteriano
 - Morfología normal
 - Relación coco bacilo 2:1
 - Cadenas de cocos de 4 y 3
 - Cadenas de 3 y 4 bacilos
 - Buena coagulación en tubo
 - Incremento de acidez de 24 °SH

LECHE CON 0.005 mcg/ml

- HALLAZGOS**
- Disminución desarrollo bacteriano
 - Cocos inhibidos en número sin formar cadenas
 - Bacilos alargados hasta 3 veces su tamaño.
 - Relación coco bacilo 2:1
 - Coagulación ausente
 - Incremento de acidez en tubo 2° SH

LECHE CON 0.01 mcg/ml

- HALLAZGOS:**
- Desarrollo bacteriano disminuido
 - Morfología, los bacilos se mostraron alargados 2 veces su tamaño, inhibición del No. de cocos.
 - Relación coco bacilo 2:1
 - Bacilos y cocos aislados
 - Coagulación ausente
 - Incremento de acidez 6° SH

LECHE CON 0.05 mcg/ml

- HALLAZGOS
- Desarrollo bacteriano inhibido el número de cocos.
 - Morfología : bacilos engrosados, alargados hasta 3 veces su tamaño.
 - Relación coco bacilo 1:2
 - Cadenas, no formaron cadenas
 - Falta de coagulación en tubo
 - Incremento de acidez 0.8° SH

LECHE CON 0.10 mcg/ml.

- HALLAZGOS
- Inhibición de desarrollo de ambas bacterias.
 - Morfología, bacilos alargados hasta 3 veces su tamaño, cocos pequeños.
 - Relación coco bacilo de 1:4
 - Falta de coagulación en tubo.
 - Sin incremento de acidez 2° SH

LECHE CON 0.5 mcg/ml.

- HALLAZGOS
- Inhibición total del desarrollo de las bacterias, solo se encontró 18 cocos y 5 bacilos en todo el frotis.
 - Morfología, bacilos alargados hasta 4 veces su tamaño, cocos aislados
 - Sin coagulación en tubo
 - Nulo incremento de acidez 0° SH

PRUEBA CON POLIMIXINA

Con esta prueba se presentaron resultados negativos a la presencia de éste antibiótico a partir de la concentración No. 1 que fue de 0.05 U.I./ ml de leche.

Mostraron un incremento de acidez bueno en comparación con el testigo que fue de 18° SH y obteniendo de las muestras incrementos desde 16.4 a 21° SH.. El pH no varió mucho y su comportamiento fue parecido al del testigo 6.58 antes de la incubación y 5.31 posterior a la incubación (cuadro No.2) Todos mostraron buena coagulación en tubo.

CUADRO No. 2

PRUEBA CON POLIMIXINA

LECHE	*SH ANTES INCUBACIÓN	*SH POST INCUBACIÓN	*SH DE DIFERENCIA	RESULTADO	INTERPRETACIÓN DE COAGULACIÓN	pH ANTES INCUBACIÓN	pH POST INCUBACIÓN
TESTIGO	10	28	18	NEGATIVO	+++	6.58	5.31
TUBO 1 0.05 UI/ml	10	27.6	17.6	NEGATIVO	+++	6.55	5.39
TUBO 2 0.1	10.8	30.4	19.6	NEGATIVO	+++	6.52	5.43
TUBO 3 0.5	12.8	34	21.2	NEGATIVO	+++	6.49	5.25
TUBO 4 1.0	14.4	34	19.6	NEGATIVO	+++	6.40	5.36
TUBO 5 1.5	17.6	34	16.4	NEGATIVO	+++	6.37	5.30

L.STD = Leche estándar

SH = Grados Soxhlet-Henkel

- = No formó coagulación

++ = Con grumos

+++ = Buena coagulación

Se observó al microscopio frotis de las muestras observando los siguientes hallazgos.

LECHE TESTIGO: Libre de antibióticos

- HALLAZGOS
- Desarrollo bacteriano, bueno en número .
 - Morfología normal
 - Relación coco bacilo 1:1
 - Buena coagulación
 - Bueno el incremento de acidez de 18° SH

LECHE CON 0.05 U.I./ ml.

- HALLAZGOS
- Buen desarrollo bacteriano
 - Morfología; se observaron cocos y bacilos normales.
 - Relación coco bacilo 3:1
 - Cadenas de 4 cocos, 6 cocos y en pares.
 - Cadenas de 8 bacilos, 3, y pares uno largo y otro corto.
 - Buena coagulación en tubo e incremento de acidez de 17.6° SH

LECHE CON 0.10 U./ML.

- HALLAZGOS
- Desarrollo bacteriano bueno.
 - Morfología se observaron bacilos alargados hasta dos veces su tamaño.
 - Relación coco bacilo 4:1
 - Cadenas de 4 cocos.
 - Cadenas de 3 bacilos.
 - Buena coagulación en tubo e incremento de acidez de 19.6° SH..

LECHE CON 0.5 U.I./ ml.

- HALLAZGOS
- Desarrollo bacteriano bueno.
 - Morfología, bacilos alargados.
 - Relación coco:bacilo 2:1
 - Cadenas de bacilos de 3 y de 2 alargados e hinchados.
 - Cadenas de cocos con 4 y con 5.
 - Coagulación completa.
 - Incremento de acidez de 21.2° SH

LECHE CON 1. U.I./ml.

- HALLAZGOS
- Desarrollo bacteriano con disminución en el número de bacilos.
 - Morfología cocos normales, bacilos alargados,
 - Relación coco:bacilo 5:1
 - Cadenas de 4 cocos
 - Cadenas de 5 bacilos de diferentes tamaños e hinchados.

LECHE CON 1.5 U.I./ ml.**HALLAZGOS**

- Desarrollo bacteriano, con disminución en el número de bacterias en comparación con la muestra anterior.
- Morfología : bacilos alargados 3 veces su tamaño.
- Relación coco:bacilo 1:1
- Cadenas de 4 y 3 cocos.
- Cadenas de 3 bacilos alargados.
- Buena coagulación.
- Buen incremento de acidez de 16.4° SH

PRUEBA CON BENCIL PENICILINA SÓDICA

Las primeras tres muestras presentan negatividad a las siguientes concentraciones 0.002, 0.005 y 0.01 U.I/ml y las dos siguientes presentaron positividad a la presencia de antibiótico, con un incremento de acidez bajo en relación al testigo de 18°SH, 6.8 y 8°SH respectivamente con un pH antes de la incubación de 6.58 y posterior a la incubación de 4.95 del testigo. (Cuadro No.3).

CUADRO No.3

PRUEBA CON BENCIL PENICILINA SÓDICA

LECHE	*SH ANTES INCUBACIÓN	*SH POST INCUBACIÓN	*SH DE DIFERENCIA	RESULTADO	INTERPRETACIÓN DE COAGULACIÓN	pH ANTES INCUBACIÓN	pH POST INCUBACIÓN
TESTIGO	10	28	18	NEGATIVO	+++	6.58	4.95
TUBO 1 0.005 U.I/ml	10	30	20	NEGATIVO	+++	6.54	4.94
TUBO 2 0.01	11.2	30	18.8	NEGATIVO	+++	6.52	4.90
TUBO 3 0.05	11.2	30.2	18.8	NEGATIVO	+++	6.50	4.99
TUBO 4 0.10	11.2	18.0	6.8	POSITIVO	-	6.53	5.40
TUBO 5 0.5	10	18	8	POSITIVO	-	6.52	6.23

L.STD = Leche estándar

- = No formó coagulación

SH = Grados Soxhlet-Henkel

++ = Con grumos

+++ = Buena coagulación

Se realizaron frotis para la observación microscópica de los efectos del antibióticos sobre las bacterias.

LECHE TESTIGO : Libre de antibióticos

- HALLAZGOS - Desarrollo bacteriano, buen número de bacterias.
- Morfología normal.
 - Cadenas de 3 cocos y en pares.
 - Cadenas de 3 bacilos y en pares.
 - Cocos y bacilos aislados.
 - Relación coco: bacilo 2:1
 - Coagulación completa y consistente.
 - Incremento de acidez de 18 SH

LECHE CON 0.002 U.I/ml.

- HALLAZGOS - Desarrollo bacteriano con buen número de bacterias.
- Morfología bacilos normales en su tamaño.
 - Cadenas de 4 cocos en pares y aislados
 - Cadenas de bacilos de dos y tres.
 - Relación coco: bacilo de 2:1
 - Coagulación consistente.
 - Buen incremento de acidez 20 SH

LECHE CON 0.005 U.I/ml.

HALLAZGOS

- Desarrollo bacteriano, poco disminuido en número.
- Morfología, normales.
- Cadenas de 4 cocos.
- Cadenas de 3 bacilos 1:1
- Coagulación completa, buena
- Incremento de acidez de 18.8 SH

LECHE CON 0.01 U.I /ml.

HALLAZGOS

- Desarrollo bacteriano, con inhibición en el número de bacilos.
- Morfología, bacilos alargados hasta 3 veces su tamaño.
- Cadenas de 2 bacilos.
- Cadenas de hasta 24 cocos.
- Buena coagulación.
- Incremento de acidez de 18.8 SH

LECHE CON 0.05 U.I./ ml.

HALLAZGOS

- Desarrollo bacteriano con inhibición de cocos y bacilos en su número.
- Morfología, bacilos afectados en su tamaño hasta 5 veces
- Cadenas de 15 a 20 cocos
- Cadenas de 3 bacilos.
- Relación coco:bacilo 5:1
- Ausencia de coagulación poco espeso sin grumos.
- Incremento de acidez bajo de 6.8 °SH

LECHE CON 0.1 U.I./ ml.

- HALLAZGOS
- Desarrollo bacteriano, inhibición en su número en comparación con la concentración anterior.
 - Morfología; los cocos se observaron más pequeños que lo normal y los bacilos hinchados.
 - Cadenas de 4 y 8 cocos.
 - Cadena de 3 bacilos, solo una.
 - Incremento de acidez bajo 8 °SH

PRUEBA CON OXITETRACICLINA

El total de muestras estudiadas resultaron positivas a partir del tubo No. 1 con la concentración de 0.1 mcg/ml. presentando coagulación nula, con bajo incremento de acidez en relación al testigo que mostró una muy buena coagulación y una acidez de 24°SH.

El pH antes de la incubación fue de 6.45 y posterior a ello 4.91 (Cuadro No.4)

Se verificó en efecto del antibiótico sobre las bacterias en frotis, observados al microscopio, registrando lo siguiente:

CUADRO No.4

PRUEBA CON OXITETRACICLINA

LECHE	*SH ANTES INCUBACIÓN	*SH POST INCUBACIÓN	*SH DE DIFERENCIA	RESULTADO	INTERPRETACIÓN DE COAGULACIÓN	pH ANTES INCUBACIÓN	pH POST INCUBACIÓN
TESTIGO	10	34	24	NEGATIVO	+++	6.45	4.91
TUBO 1 0.1	10	14	4	POSITIVO	-	6.47	6.04
TUBO 2 0.3	10	12.8	2.8	POSITIVO	-	6.42	6.22
TUBO 3 0.5	10	12.8	2.8	POSITIVO	-	6.45	6.25
TUBO 4 0.8	10	12.8	2.8	POSITIVO	-	6.45	6.25
TUBO 5 1.0	10.4	12.8	2.8	POSITIVO	-	6.44	6.27

L.STD = Leche estándar
SH = Grados Soxhlet-Henkel

- = No formó coagulación
++ = Con grumos
+++ = Buena coagulación

LECHE TESTIGO: Libre de antibiótico.

- HALLAZGOS:
- Desarrollo bacteriano, bueno
 - Morfología, normal
 - Relación coco:bacilo 2:1
 - Cadenas de cocos de 5, 3, y en pares
 - Cadenas de 3 y 2 bacilos y hasta dos veces su tamaño normal.
 - Buena coagulación
 - Incremento de acidez en tubo de 24°SH.

LECHE CON 0.1 mcg/ml

- HALLAZGOS:
- Inhibición del desarrollo bacteriano de ambas bacterias.
 - Morfología, bacilos anormales muy alargados e hinchados.
 - Cadenas de 8 a 17 cocos.
 - Cadenas de bacilos alargados e hinchados de 5 y 6 veces su tamaño, de 2 y 7 bacilos.
 - Relación coco:bacilo 6:1
 - Coagulación nula
 - Incremento de acidez bajo 4° SH.

LECHE CON 0.3 mcg/ml

- HALLAZGOS: - Inhibición del desarrollo bacteriano.
 - Morfología, cocos pequeños.
 - Cadenas de 4, 8 cocos.
 - Relación coco:bacilo de 7:1
 - Coagulación negativa
 - Incremento de acidez bajo 2.8° SH

LECHE CON 0.5 mcg/ml

- HALLAZGOS: - Inhibición de bacilos
 - Morfología, cocos inhibidos.
 - Cadenas de 4 y 8 cocos y aislados.
 - Relación coco:bacilo, no se puede hacer por falta de bacilos.
 - Coagulación nula.
 - Incremento de acidez de 2.8° SH.

LECHE CON 0.8 mcg/ml

- HALLAZGOS: - Inhibición de cocos y bacilos en su número
 - Morfología, cocos muy pequeños.
 - Cadenas de 4 cocos y aislados
 - Cadena con 2 bacilos grandes e hinchados.
 - Coagulación negativa
 - Incremento de acidez 2.8° SH.

LECHE CON 1.0 mcg/ml

- HALLAZGOS:
- Inhibición del desarrollo bacteriano.
 - Morfología, cocos muy pequeños.
 - Cadenas de 4 a 7 cocos.
 - Relación coco:bacilo, no se puede realizar por falta de bacilos, no se desarrollaron.
 - Coagulación negativa.
 - Incremento de acidez de 2.8° SH.

PRUEBA CON DICLOXACILINA

Se identificó una inhibición bacteriana a partir del Tubo No. 1 a una concentración de 0.3 mcg/ml en leche. No mostrando coagulación y con disminución de acidez en relación al testigo. Todas las muestras resultaron positivas a la presencia del antimicrobiano con incremento de acidez de 1.6° SH. a 4° SH., siendo el testigo de 16 °SH. El pH anterior a la incubación fue de 6.56 y posterior a la incubación 4.90 del testigo, en comparación con las muestras.

CUADRO No.5

PRUEBA CON DICLOXACILINA

LECHE	*SH ANTES INCUBACIÓN	*SH POST INCUBACIÓN	*SH DE DIFERENCIA	RESULTADO	INTERPRETACIÓN DE COAGULACIÓN	pH ANTES INCUBACIÓN	pH POST INCUBACIÓN
TESTIGO	12	28	16	NEGATIVO	+++	6.56	4.90
TUBO 1 0.3	11.2	12.8	1.6	POSITIVO	-	6.54	6.53
TUBO 2 0.5	10.8	12.4	1.6	POSITIVO	-	6.61	6.41
TUBO 3 0.8	12.0	14.0	2.0	POSITIVO	-	6.55	6.41
TUBO 4 1.0	12	16	4.0	POSITIVO	-	6.50	5.12
TUBO 5 1.5	12	16	4.0	POSITIVO	-	6.48	5.12

L.STD = Leche estándar

SH = Grados Soxhlet-Henkel

- = No formó coagulación

++ = Con grumos

+++ = Buena coagulación

Para corroborar el efecto del antibiótico sobre las bacterias se hicieron frotis de las diferentes muestras, las que se observaron al microscopio con las siguientes características:

LECHE TESTIGO: Libre de antibiótico.

- HALLAZGOS:
- Buen desarrollo bacteriano.
 - Morfología, normal
 - Relación coco:bacilo 2:1
 - Cadenas de cocos de 3 y 4 y en pares
 - Cadenas bacilos de 3 y 4
 - Buena coagulación
 - Buen incremento de acidez en tubo de 16° SH.

LECHE CON 0.3 mcg/ml

- HALLAZGOS:
- Inhibición del número de bacilos
 - Morfología, bacilos alargados 5 veces su tamaño, hinchados.
 - Relación coco:bacilo 2:1
 - Nula coagulación en tubo.
 - Bajo incremento de acidez 1.6° SH.

LECHE CON 0.5 mcg/ml

- HALLAZGOS: - Inhibición de ambas bacterias.
- Morfología: bacilos hinchados y alargados cinco veces su tamaño y cocos aislados en pares.
- Relación coco:bacilo de 2:1
- Incremento de acidez bajo 1.6° SH

LECHE CON 0.8 mcg/ml

- HALLAZGOS: - Desarrollo bacteriano inhibición de ambas bacterias.
- Morfología, cocos pequeños, un solo bacilo delgado y pequeño.
- Relación coco:bacilo, solo se observó la presencia de cocos.
- Nula coagulación nula.
- Incremento de acidez bajo 2° SH.

LECHE CON 1.0 mcg/ml

- HALLAZGOS: - Inhibición del número bacteriano.
- Morfología, cocos pequeños, ausencia de bacilos en relación con el testigo.
- Relación coco-bacilo 4:1
- Cadena con 6 a 23 cocos.
- Incremento de acidez 4° SH.

LECHE CON 1.5 mcg/ml

- HALLAZGOS:
- Nulo desarrollo bacteriano en relación al testigo.
 - Morfología, bacilos alargados 3 veces su tamaño normal.
 - Relación coco:bacilo, no se puede comparar por inhibición de los bacilos encontrando solo 3 bacilos en todo el frotis.
 - Coagulación nula
 - Incremento de acidez bajo de 4° SH.

DISCUSIÓN

Dentro de los resultados obtenidos se demostró que la presencia de medicamentos en las diferentes muestras y concentraciones de los *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* fueron afectados en su morfología y número además de presentar un alargamiento de las cadenas de los mismos.

Según el tipo de antibiótico las bacterias del yoghurt se inhibieron indistintamente; en algunos casos no se desarrollaron los bacilos, así como la falta de producción de acidez y coagulación en tubo, notando también que los *Streptococcus* se inhibieron en altas concentraciones del antibiótico. (10, 13)

Es necesario que el Médico Veterinario actúe con ética y profesionalismo, para evitar qué residuos de antimicrobianos lleguen al consumidos provocando serios problemas de Salud Pública.

Por lo que a él compete informar al propietario sobre los períodos de restricción que se deben observar posterior a una terapia de alguna enfermedad, así como el conocimiento de la Farmacocinética y Farmacodinamia de los antibióticos a utilizar, también tiene que considerar los factores fisiológicos de absorción, distribución y eliminación del fármaco, como son las características propias del medicamento influyendo en ellos, los solventes o vehículos en que son administrados, como la sal misma. (17,18)

En este estudio se utilizaron 5 fármacos de uso frecuente en clínica de bovinos, los cuales cada uno tiene sus propias características de absorción, biotransformación y eliminación, así como su efecto sobre las bacterias termofilicas del Yoghurt.

BENCIL PENICILINA SÓDICA

Con esta prueba se demostró la sensibilidad de los *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* fueron inhibidos a partir de la concentración 0.05 U.I./ml la producción de acidez fue solo de 2.2° SH. en comparación con el testigo que obtuvo 18 °SH. no alcanzó la muestra ni la mitad del incremento de éste último. El pH por lo tanto no se vio alterado así como la coagulación en tubo no se presentó.

La observación del frotis en el microscopio de las bacterias termofilicas demostró que fueron inhibidas por lo que se corroboró la sensibilidad de estos microorganismos a la Penicilina, en comparación con otros estudios; Se ha demostrado que *B. subtilis* en agar detecta 0.01 - 0.06 U.I./ml notando que en esta prueba no fueron muy sensibles a esa concentración. Existen otro gran número de pruebas sensibles a la penicilina en el cual detectaron en el rango de 0.002 U.I./ml. de leche, la cual el resultado de esta prueba es válido porque en la práctica Veterinaria lechera se han detectado concentraciones mayores a las de 0.05 U.I./ml. (12,18)

Las penicilinas naturales como la G. sódica que se utilizó en este estudio, son administradas a los animales por vía intramuscular, alcanzando niveles terapéuticos mínimos en sangre en 30 minutos (0.03 mcg/ml), y son distribuidas fácilmente a diferentes tejidos. (17)

Las penicilinas naturales se excretan en un porcentaje aproximado del 80% por vía renal sin biotransformación y un 20% restante se aloja en tejidos o líquidos corporales. Las penicilinas se unen a las proteínas plasmáticas en proporción variable de ahí su presencia en leche la cuál por esta vía tarda hasta 96 horas para eliminarla completamente, en cambio en tejidos hay que esperar 5 días para que no se detecten residuos de este medicamento (15, 17, 18.)

Tras la aplicación intramuscular de 5 millones de U.I. animal; 24 horas después se han detectado 0.012 U.I./ml de leche. Por vía intramamaria se han aplicado 100,000 U.I./cuarto en solución oleosa, la eliminación se mantiene hasta por 4 días cuando el intervalo entre los ordeños es de 12 horas, y puede durar hasta 8 días si se ordeña a la vaca solo cada 24 horas. (18)

Según el tipo de preparado, la vía de aplicación y las circunstancias particulares del animal afectado será la variación de la velocidad de eliminación.

Organismos oficiales como la F.D.A. recomiendan retirar del mercado la leche de 4 ordeños o 48 horas posteriores a la última aplicación del antibiótico, así como durante la terapia de la enfermedad, para evitar que ésta sea consumida. (7).

La O.M.S. no permite que existan residuos en leche más allá de 0.006 U.I/ml. , siendo éste el máximo permisible, para que no sea nociva para el consumo (18)

AMPICILINA

En este estudio hubo una inhibición de las bacterias termofílicas a partir de la muestra No. 1 que contenía la siguiente concentración 0.005 mcg/ml.. Hubo un efecto en la disminución de la acidez y por lo tanto no se produjo coagulación el tubo., el pH no presentó cambios considerables antes y después de la incubación. La observación de las bacterias al microscopio fue la siguiente: conforme aumentaba la concentración los *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* se inhibieron en un gran porcentaje, dado por el amplio espectro de la ampicilina, por lo tanto las bacterias del Yoghurt son muy sensibles a éste antibiótico.

En comparación de los resultados con otros autores, no se tiene registrado la concentración mínima inhibitoria con la prueba de Yoghurt, pero con otras pruebas de vaciado en placa con *Bacillus stearothermophilus*, se han logrado detectar de 0.004 a 0.01 mcg/ml. en leche, por lo que la prueba del Yoghurt es una buena opción para detectar residuos en mínimas cantidades. La Ampicilina por ser un antibiótico sintético, tiene una farmacocinética semejante a la penicilina, de la cual se deriva ésta. A diferencia de las penicilinas naturales, la ampicilina posee características especiales que se unen más del 50% a la secreción del tejido de la ubre. Lo que facilita su acumulación en los diferentes tejidos animales y por lo consiguiente en leche. (12,17)

Se han demostrado que se excretan por vía láctea niveles superiores a los detectados en este estudio 0.005 mcg/ml, y que permanecen hasta 48 horas posteriores a la última aplicación, así como su acumulación en tejidos hasta por 6 días. (15)

F.D.A. Recomienda un periodo de restricción con el uso de este medicamento para la venta de leche de vacas tratadas, por cuatro ordeños; deberá ser evitado el consumo de ésta. (7,2)

POLIMIXINA

En los resultados de este estudio se mostró que las bacterias del Yoghurt (*S thermophilus* y *L bulgaricus*) no fueron sensible a la presencia de pequeñas cantidades de éste medicamento, por lo que no se altero la producción de acidez y la formación del coágulo en tubo.

El espectro del las polimixinas es reducido a bacterias gram negativas, de ahí su importancia de combinarlo con otro tipo de antibiótico para crear un sinergismo y atacar mayor cantidad de bacterias. (17).

Al microscopio se observo que hubo una sensibilidad de Lactobacilos, presentando alteraciones morfológicas pero sin dañar la simbiosis y la relación coco:bacilo,

Este tipo de medicamento se aplica generalmente por vía oral como promotor de crecimiento debido a la escasa absorción por tracto digestivo, pero existen preparados para su aplicación tópica, una de ellas es la vía intramamaria en casos de mastitis, la vía I.M. es poco usada.

Las polimixinas se absorben lentamente en la ubre normal, más del 95 % de la dosis, se puede recuperar en leche después de la infusión de 200 mg. de la droga, en solución acuosa se puede detectar residuos del fármaco durante la novena y décima ordeña (5 días de intervalo). Tiene una gran afinidad por riñón hígado y músculo esquelético, por lo cuales de gran importancia en Salud Pública. No se han reportado niveles mínimos de polimixinas en leche con pruebas de Yoghurt ni con otros métodos. Por tal motivo se incluyó en este estudio (17,18).

El reglamento de la ley general de Salud en México en materia de control Sanitario de Actividades y Establecimientos y Servicios, indica que no deben existir residuos de fármacos en leche para su comercialización en sus artículos 34 y 248 (9).

La S.A.R.H. en sus disposiciones para químicos, alimentos biológicos, y vitaminas en su leyenda No. 37 con referencia al producto comercial (utilizado) menciona que no se debe utilizar para consumo humano, la leche procedente de animales tratados con polimixina hasta 4 días de su última aplicación (14)

La OMS no permite más de 1.2.U.I./ml. de leche.

OXITETRACICLINA

Este medicamento es de uso común en la práctica Veterinaria, lo que motiva a efectuar pruebas con mínimas concentraciones en la producción de Yoghurt con bacterias termofílicas para probar el grado de sensibilización de estas. Los resultados obtenidos de las muestras fueron positivos a partir de la concentración 0.1 mcg/ml con una acidez de 4° SH. post-incubación de diferencia. El testigo demostró 24° SH de incremento. El espectro amplio de la oxitetraciclina afectó la producción de bacilos y cocos del yoghurt en concentraciones menores (0.1 mcg/ml) que las marcadas por autores que han realizado pruebas con el yoghurt registrando inhibición a partir de 0.3 mcg/ml. Mediante otros métodos de vaciado en placa con *B. cereus* han detectado 0.05 - 0.1 mcg/ml., y con *B. stearothermophilus* 0.5 mcg/ml. (12,18)

La Oxitetraciclina tiene varias vías de aplicación por lo cual varía su absorción y distribución en el organismo, por vía oral existen niveles plasmáticos en 2 o 4 horas. Y por vía intramuscular se absorbe bastante bien y se detectan niveles en plasma a los 15'. Se distribuye en todo el cuerpo, en concentraciones antibacterianas adecuadas. La eliminación es principalmente por riñones, pero es lenta, lo que explica que persistan niveles plasmáticos altos durante mucho tiempo; en leche se empieza a excretar a la hora de ser aplicado por vía intravenosa, esto se caracteriza por la tendencia a combinarse con proteínas, la oxitetraciclina es demostrable en leche hasta 72 horas después de aplicarla y la eliminación persiste hasta 4 ordeños o 48 horas posterior a la última aplicación (5,17,18)

La SARH recomienda un periodo de restricción para el consumo de leche por 60 horas o 5 ordeños, para evitar que sea consumida y crear problemas de Salud Publica.

La OMS. no permite más de 0.1 mcg/ml en leche. (18)

DICLOXACILINA

Los resultado obtenidos en esta prueba fueron positivos a la presencia del antibiótico en leche a partir de la concentración menor que fue de 0.3 mcg/ml de leche, con un incremento de acidez posterior a la incubación de 1.6° SH. en relación al testigo que obtuvo 16° SH. y por lo tanto la ausencia de la coagulación en tubo.

Al microscopio se observo que las bacterias fueron muy sensibles a la Dicloxacilina, mostraron deformaciones morfológicas como alargamiento de los bacilos y agrandamiento de los cocos, esto por el espectro específico del antibiótico a las bacteria gram positivas y por ser éste un derivado sintético de las penicilinas, cobra la importancia en los nuevos tratamientos para las patologías de la ubre (mastitis), así como atacar bacterias productoras de penicilinasas que crean resistencia a las penicilinas naturales. Siendo este tipo de antimicrobiano una nueva opción en la terapéutica veterinaria.

La absorción es muy satisfactoria por vía parenteral se combina con las proteínas plasmáticas entre un 80 y 95 %, su eliminación por leche es cuestionable ya que se han detectado concentraciones mayores a 0.3 mcg/ml en leche. (17,18)

No se han reportado datos específicos con este medicamento con la prueba de yoghurt, por tal motivo se incluyó en este estudio. Se han reportado resultados de inhibición bacteriana con otros derivados sintéticos de penicilina como la cloxacilina, la cual han detectado residuos mediante las pruebas de difusión en placa con *B. stearothermophilus* de 0.03 mcg/ml., con *B. subtilis*, no se registran datos, pero con las bacterias del yoghurt notan una inhibición de los *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* a partir de la concentración de 0.5 mcg/ml en leche, demostrando una sensibilidad menor a la registrada por otros autores, mediante las pruebas realizadas con este trabajo. (7)

La eliminación de este tipo de productos administrados a vacas lecheras en el curso de la lactación dura de 5 a 15 días, dependiendo el vehículo utilizado y de la velocidad de absorción.(18) En México la SARH. no permite el consumo de leche procedente de vacas tratadas con este antibiótico hasta 4 días después de la última aplicación, así como el Reglamento de la Ley General de Salud, indica que no deben existir residuos de ningún contaminante en leche para que pueda ser consumida. (9,14)

La elevada sensibilidad de las bacterias lácticas empleadas en la tecnología de la leche para la elaboración de productos fermentados es bien conocida, el uso de antibióticos empleados en Medicina Veterinaria como los mencionados en este trabajo, tienen efecto perjudicial en las diferentes concentraciones estudiadas presentes en leche, sobre la fermentación láctea que es de suma importancia.

La industria procesadora tiene elevadas pérdidas económicas por el desarrollo de baja acidez; la falta de inhibición del proceso de fermentación microbiana que afecta la manufactura de numerosos productos lácteos. (10, 16)

La presencia de residuos de antimicrobianos en leche depende de varios factores intrínsecos y extrínsecos en relación a la vaca tratada, como lo son, tipo de fármaco, vehículo, que nos dará la pauta a la absorción, distribución y excreción del mismo, así como el estado de nutrición del animal tanto como el periodo de lactación en que se encuentre sometido. (13)

Las consecuencias de los residuos no deben ser minimizadas a pesar de que es difícil estimarlas por no disponer de cifras y estudios idóneos en México.

Esta cuestión se ha tratado y a en razón de las consecuencias técnicas que suponían su uso. Potencialmente son peligrosos para el hombre por diversas razones: desarrollo de cepas de microorganismos resistentes al antibiótico, reacciones alérgicas (demostrados con indicios de penicilina). alteración del equilibrio de la flora bacteriana intestinal por riesgo de toxicidad por el uso de asociaciones de antimicrobianos, entre otros. (2,6,8)

Por razones evidentes los residuos al no ser controlados, se presentan con frecuencia. Se debe tener precaución y un programa de control oficial para limitar la presencia de antibióticos en leche y que posteriormente son consumidos.

Los productos farmacéuticos Veterinarios destinados a las especies productoras de alimento para el hombre, trae por ley instrucciones sobre los períodos de restricción, es decir el tiempo que debe transcurrir desde la administración del fármaco, que no aparezcan residuos de éste en los alimentos.

Estos períodos no son respetados y al no ser infraccionados a los responsables, se espera que ocurran los residuos comúnmente. (13,16)

Las estrategias de prevención de residuos deben ser orientadas para los productores y profesionales en cuestión y adopten medidas de control, que particularmente en la producción sean efectivas para reducir la ocurrencia, de residuos violatorios, y evitar que mermen la producción del yoghurt y lácteos fermentados así como la calidad del producto terminado. (16)

CONCLUSIONES

- 1.- La fermentación láctica se vio afectada a partir de las siguientes concentraciones de antibióticos.

AMPICILINA; 0.005 mcg/ml.

BENCIL PENICILINA SÓDICA; 0.05 U.I/ML.

DICLOXACILINA; 0.3 mcg/ml.

POLIMIXINA NEGATIVO

OXITETRACICLINA; 0.1 mcg/ml.

- 2.- La acidez no se produjo al ser inhibidas las bacterias termofílicas por el antibiótico, así como la falta de coagulación.
- 3.- Hubo modificación morfológica de los *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* en las diferentes concentraciones antibióticas.
- 4.- La Polimixina no afectó la producción del Yoghurt, en concentraciones de este trabajo, creando una acidez y pH adecuado para la coagulación del mismo.
- 5.- El manejo de fármacos deberá ser restringido a profesionales en el ramo, para evitar residuos en los alimentos de origen animal.

- 6.- El método es sencillo de elaborar en un laboratorio, obteniendo resultados en 3 horas.
- 7.- Es importante el desarrollo de nuevas técnicas para la detección oportuna de residuos de medicamentos en leche.



BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **AMABILE C.C., 1988: LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS. CIENCIA Y DESARROLLO MAYO- JUNIO No. 8 PAG. 57-58, MÉXICO**
- 2.- **ALAIS, C. 1991: CIENCIA DE LA LECHE. PRINCIPIO DE TÉCNICA LECHERA, EDIT. CESA 1970 OCTAVA REIMPRESIÓN, MÉXICO**
- 3.- **ALLISON, J.R.D.; ANTIBIOTIC RESIDUES IN MILK, BRITISH. JOURNAL VET. 141-1 PAG. 9-10. USA**
- 4.- **AUSTIN, H.; 1977: A RATIONAL APPROACH TO THE USE OF ANTIBIOTIES IN VETERINARY PRACTICE. VET. JOURNAL 26: 26.U.S.A.**
- 5.- **BOGAN J.A., LEE, P. A.T. YOXALL. 1986: FARMACOLOGÍA PARA ANIMALES DOMÉSTICOS Y GRANDES ESPECIES TOMO I EDIT. PLM. CIENTÍFICA. MÉXICO**
- 6.- **CALDERÓN J.E. 1981: APLICACIÓN CLÍNICA DE ANTIBIÓTICOS Y QUIMIOTERAPICOS. EDIT. CENTEOLL MÉXICO.**
- 7.- **CENTER FOR VETERINARY MEDICINE MEMO 1987: DRUG USE GUIDE: DAIRY AND CALVES U.S. DEPARTAMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICE PUBLIC. HEALTH SERVICE FOOD AND DRUG ADMINISTRATION No. 27 U.S.A.**

- 8.- CERCOS, P.; 1985: **USO NO MEDICO DE LOS ANTIBIÓTICOS Y REPERCUSIÓN SOBRE LA SALUD**. EDITORIAL ALBATROS PAG. 30-43. ARGENTINA
- 9.- DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN. 1988: **REGLAMENTO DE LA LEY GENERAL DE SALUD EN MATERIA DE CONTROL SANITARIO DE ACTIVIDADES, ESTABLECIMIENTOS Y SERVICIOS**. SECRETARIA DE SALUD, MEX. D.F. 1ra SECCIÓN.
- 10.- F.A.O. 1981: **MANUAL DE CULTIVOS LÁCTICOS Y PRODUCTOS FERMENTADOS** PAG. 3.1. CHILE
- 11.- F.A.O. 1981: **MANUAL DE COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DE LA LECHE** PAG.1.4. CHILE
- 12.- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION 1991 **DETECTION OF INHIBITOR MILK O MILK PRODUCTS**. FIL-IDF BOLLETIN No.258 PAG. 46-48 BÉLGICA
- 13.- PACHECO, G.C.1990 **INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTIBIÓTICOS EN LA ACIDEZ Y COAGULACIÓN DE LA LECHE**. TESIS PROFESIONAL DE LICENCIATURA. FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA. UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA. GUADALAJARA, JALISCO.
- 14.- POWERS, T.E. 1980 **CLÍNICA VETERINARIA DE NORTE AMÉRICA, FARMACOLOGÍA EN LOS ANIMALES DOMÉSTICOS**. EDITORIAL HEMISFERIO SUR. PAG.1. ARGENTINA.

- 15- P.L.M. 1993-1994: **PRONTUARIO DE ESPECIALIDADES VETERINARIAS 14a EDICIÓN. MÉXICO.**
- 16- RAMÍREZ, A.A. Y REAL N.M. 1991 **CONTAMINACIÓN DE LA LECHE QUE SE CONSUME EN GUADALAJARA, MÉXICO CON RESIDUOS DE SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS. MEMORIAS CONGRESO PANAMERICANO DE LECHE, PAG 116, MÉXICO**
- 17- SUMANO, L.M.; OCAMPO, C.L. 1988: **"FARMACOLOGÍA VETERINARIA" EDIT. INTERAMERICANA. PAG. 113-165. MÉXICO**
- 18- TROLLDENIER, H. 1987: **ANTIBIÓTICOS EN MEDICINA VETERINARIA. EDITORIAL ACRIBIA PAG 21-26. ESPAÑA.**