



DEPARTAMENTO DE POSTGRADOS

“Detección de la presencia de Aflatoxina M1 y Antibióticos en leche cruda de las fincas de mayor producción del cantón Biblián”.

“MAGÍSTER EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA”

ING. MAIRA ORTIZ ALVARADO

MARÍA ELENA CAZAR. Ph. D.

CUENCA, ECUADOR

2014

DEDICATORIA

Para ti, Yanua Paz Rivera Ortiz,
Mujer que brilla e ilumina
mi sendero, mis metas, mis anhelos.
Porque fuiste tú quien me motivó a encontrar este gozo,
Porque eres tu quien desencadena mis sueños y
Porque siempre serás tú quien fortifique mis esfuerzos.

Tu Mami tuti.

AGRADECIMIENTO

La Gratitude es uno de los sentimientos que más engrandece el alma, me siento orgullosa de reconocer a todos quienes participaron directa e indirectamente en la ejecución de este trabajo, por ello quiero mencionar en especial a:

- Dios, quien me premia con la vida
- Mis Padres, por su entrega incondicional y paciencia para sostener mis esfuerzos como un andamio forjador.
- Mi Esposo por su amor y comprensión
- A la Universidad del Azuay, y todo el equipo profesional de postgrados y en especial a la Dra. María Elena Cazar por su entrega a la ciencia y guía en este trabajo
- A la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro AGROCALIDAD, por su apoyo y colaboración con equipos y materiales para la ejecución de esta investigación.
- A todos mis compañeros quienes me apoyaron en el trabajo de campo

Mis sinceros reconocimientos y apego por su ayuda.

RESUMEN

En el presente estudio se determinó la presencia de residuos de Aflatoxina M1 y antibióticos en la leche cruda producida en 22 fincas con la mayor producción lechera del cantón Biblián, en la provincia de Cañar.

Para determinar la presencia de estas biomoléculas se realizaron pruebas “in vitro” utilizando kits de diagnóstico cualitativo rápido (SNAP AFLA, Triaminosensor y Trisensor). Según los resultados obtenidos se determina ausencia de aflatoxina M1 y presencia de antibióticos betalactámicos, neomicina y gentamicina, en 10 de las 22 fincas, con 17 resultados positivos.

Por ello se debe reforzar los controles de comercialización de productos de uso veterinario, tanto para alimento como para uso terapéutico y concientizar a los productores la aplicación de buenas prácticas que prevengan la contaminación del producto, las pérdidas económicas ocasionadas y la afección a la salud pública.

Palabras clave: Aflatoxina, Antibiótico, Leche, Residuos

ABSTRACT

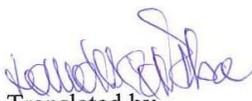
Through this study we were able to identify the presence of aflatoxin M1 levels and antibiotics residues in raw milk produced in 22 farms, which represent the highest milk production of Biblián Canton in the province of Cañar.

To determine the presence of these biomolecules we performed "in vitro" tests using qualitative diagnostic kits by means of immunoenzyme analysis methods, (SNAP AFLA, Triaminosensor and Trisensor). According to the results of 88 samples analyzed, there was no presence of aflatoxin M1. However, a positive result of 19% presence of beta-lactams antibiotics, neomycin and gentamicin was determined in 10 of the 22 farms analyzed.

In conclusion, we should strengthen controls for the marketing of veterinary products, both for food and for therapeutic use, as well as create awareness among producers in regard to good practices to prevent product's contamination, economic losses and public health condition.

Keywords: Aflatoxin, Antibiotic, Milk, Waste




Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

INDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
DEDICATORIA.....	li
AGRADECIMIENTO.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
INDICE DE CONTENIDOS.....	vi
INDICE DE ANEXOS.....	viii
INDICE DE CUADROS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	X

INTRODUCCION

1. CONTAMINACION DE PRODUCTOS LACTEOS POR MICOTOXINAS AFLATOXINAS.....	11
1.1. AFLATOXINAS.....	11
1.2. AFLATOXINA M1.....	12
1.3. ABSORCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE LAS AFLATOXINAS EN EL ORGANISMO ANIMAL.....	14
1.4. CONSECUENCIAS PARA LA SALUD PÚBLICA.....	14
2. CONTAMINACIÓN DE PRODUCTOS LACTEOS POR ANTIBIÓTICOS.....	17

2.1. ANTIBIÓTICOS.....	18
2.2. RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS.....	18
2.3. TIEMPO DE RETIRO.....	19
2.4. RIESGOS PARA LA SALUD.....	20

CAPITULO I: MATERIALES Y METODOS

1.1. ÁREA DE ESTUDIO	24
1.2. TOMA DE MUESTRAS	24
1.3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	27
1.3.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE AFLATOXINA M1	28
1.3.2. ANÁLISIS CUALITATIVO DE ANTIBIÓTICOS.....	30

CAPITULO II: RESULTADOS

2.1. DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1.....	33
2.2. DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS.....	33

CAPITULO III: DISCUSION

3.1. DETECCIÓN DE AFLATOXINAS.....	36
3.2. DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS.....	37

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES	39
RECOMENDACIONES	40
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	42

ANEXOS

1. CUADRO DE IDENTIFICACIÓN DE LAS 22 FINCAS DE ESTUDIO.....	46
2. ENCUESTA A GANADEROS.....	47
3. FOTOGRAFÍAS DE LA TOMA Y ANALISIS DE MUESTRAS.....	49
4. INTERPRETACIÓN VISUAL DE LOS RESULTADOS DEL KIT TRISENSOR.....	50
4. INTERPRETACIÓN VISUAL DE LOS RESULTADOS DEL KIT TRIAMINOSENSOR.....	50
6. DISTRIBUCIÓN DE LAS FINCAS EN EL AREA DE ESTUDIO.....	51

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°1.	REGULACIÓN DE LOS LMR DE AFLATOXINA M1.....	16
CUADRO N°2.	REGULACIÓN DE LOS LMR DE ANTIBIOTICOS EN LECHE Y SU RELACIÓN CON LA SENSIBILIDAD DEL METODO DE DETECCIÓN UTILIZADO EN EL PRESENTE ESTUDIO.....	22
CUADRO N°3.	PROCEDIMIENTO PARA LA COLECCIÓN DE MUESTRAS EN CAMPO.....	25
CUADRO N°4.	PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LA PRUEBA DE AFLATOXINAS.....	29

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1.	BIOTRANSFORMACIÓN DE LA AFLATOXINA B1 EN AFLATOXINA M1.....	12
FIGURA N°2.	TOMA DE MUESTRAS.....	27
FIGURA N°3.	MUESTRAS DE LECHE.....	27
FIGURA N°4.	REFRIGERACION PARA TRANSPORTE DE MUESTRAS.....	27
FIGURA N°5.	PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS SEGUN EL TIPO DE FARMACO POR FINCA.....	34
FIGURA N°6.	PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS SEGÚN LA ZONA.....	35

Ortiz Alvarado Maira Briscila

Trabajo de Graduación

María Elena Cazar, Ph.D.

Febrero 2014

“Detección de la presencia de Aflatoxina M1 y Antibióticos en leche cruda de las fincas de mayor producción del cantón Biblian”.

INTRODUCCIÓN

1. CONTAMINACIÓN DE PRODUCTOS LACTEOS POR MICOTOXINAS AFLATOXINAS.

La leche es el único material producido por la naturaleza para funcionar exclusivamente como alimento, es una fuente nutritiva no superada por ningún otro alimento conocido por el ser humano, por lo cual es utilizada como parte de la dieta diaria de todos los pueblos, (Magariños, H. 2000). Las cualidades nutritivas de la leche y los productos lácteos son indiscutibles. No obstante, desde su síntesis en la glándula mamaria hasta su llegada al consumidor, estas cualidades están sometidas a un gran número de riesgos que hacen peligrar no solo la calidad original del producto sino la salud de quien la consume.

Existen riesgos para el consumidor de leche, que se pueden generar desde la finca de producción del animal, o antes del manejo del ganado, con la producción agrícola de los insumos empleados en la alimentación de éste. Riesgos que provienen desde el primer eslabón de la cadena láctea.

1.1. AFLATOXINAS.

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, que pueden causar altos niveles de contaminación en los productos básicos agrícolas, (Zuber, M. et al 1983). Los hongos productores de aflatoxinas se encuentran ampliamente distribuidos, ya que el *Aspergillus flavus* crece a una temperatura que oscila entre los 10 y los 42°C, con una humedad relativa del 70%. Los alimentos que son sustratos adecuados para el desarrollo de hongos productores de aflatoxinas son el maíz, cacao, sorgo, trigo, avena, centeno, algodón, cacahuete, etc. (Martínez, J. 2002).

Según Armijo, J. & Calderón, J., de los 20 tipos diferentes de aflatoxinas identificados, las más comunes son: - Aflatoxina B1 (AFB1), - Aflatoxina M1 (AFM1) (metabolito de la B1) - Aflatoxina B2 (AFB2) Aflatoxina G1 (AFG1) - Aflatoxina G2 (AFG2)

1.2. AFLATOXINA M1.

La aflatoxina M1 fue aislada por primera vez en leche y fue codificada por la fuente de su aislamiento (milk), el número 1 se deriva de la aflatoxina B1 (AFB1), micotoxina que se produce principalmente por hongos que contaminan el maíz.

La aflatoxina M1 (AFM1) es el derivado 4-hidroxi de la AFB1 y es excretada en la leche de las hembras de mamíferos que consumen AFB1 en su dieta.

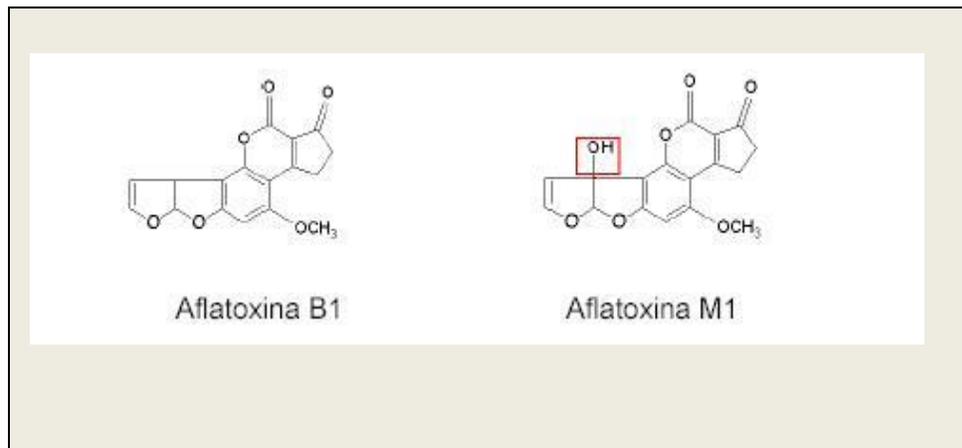


Figura N.º 1. Biotransformación de la aflatoxina B1 en Aflatoxina M1.

Fuente: Vásquez M., 2006

La contaminación de la leche con residuos de Aflatoxina M1, depende del tipo de alimentación que se da al animal ya que la leche es el fiel reflejo de lo que el animal consume, hay que considerar que el ganado lechero, en su mayoría se alimenta de pastos frescos y/o ensilados, y de fórmulas balanceadas elaboradas a base de mezclas de granos tales como, maíz, trigo, cebada, pepa de algodón, arrocillo, maní, etc., que provienen de cultivos intensivos de diferentes zonas de nuestro país.

La calidad y la seguridad del alimento animal depende de varios factores implicados en las prácticas agrícolas utilizadas para el cultivo, cosecha, transporte y almacenamiento de cada uno de los insumos utilizados. Factores que influyen en el crecimiento de hongos del género *Aspergillus*, *A. flavus* y *A. parasiticus*, como las condiciones del clima, la humedad, la temperatura, pH, actividad de agua de cada grano.

Estos factores extrínsecos y las prácticas de cultivo, presencia de insectos, roedores, las prácticas de cosecha, de almacenamiento y de transporte de cada uno de los ingredientes de una dieta animal se consideran un riesgo para la contaminación fúngica del alimento del

ganado lechero. Vásquez M., menciona que el rango de temperatura que favorece el crecimiento de **A.flavus** y **A.parasiticus** es desde los 6 - 46 °C, mientras que los miembros del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), en su informe 2011, exponen que el desarrollo ideal de **A.flavus** y **A.parasiticus** se da con un actividad de agua de 0,8 - 0,99 y con un pH de 2 - 11. Las toxinas, una vez metabolizadas pueden sobrevivir a pesar de que ya no exista presencia fúngica, y las temperaturas que favorecen el crecimiento toxigénico de las aflatoxinas están entre los 12 y 40°C siendo el óptimo desde los 16 - 31°C.

Las fincas de mayor producción lechera del Cantón Biblián, utilizan alimentos balanceados que incluyen en sus fórmulas granos que provienen de diferentes lugares del país, que bajo diferentes condiciones podrían estar contaminados tanto con especies fúngicas de **Aspergillus flavus** y **Aspergillus parasiticus**, como con sus metabolitos de carácter tóxico como la aflatoxina B1.

En estudios realizados por La Organización para la Agricultura y la alimentación (FAO), a nivel mundial se estima que el 25% de la producción de cultivos es afectada por las micotoxinas, mientras que según Vallejo M. (2012), luego de una investigación de la contaminación del maíz con aflatoxinas realizada en Sangolquí - Pichincha, concluye que: *la harina de maíz analizada en el presente trabajo representa una amenaza tanto para la salud pública como el sector pecuario, ya que es un riesgo latente y constante debido a la presencia en algún grado de AFB1 sustancia cancerígena, en el 78% de las muestras analizadas en maíz.*

Por otro lado, un estudio realizado sobre los niveles de contaminación con aflatoxina en maní, Fierro K (2012) concluye que: *la ocurrencia de aflatoxinas en las muestras de maní fue del 70% sin clasificar su origen, de las cuales el 57% de las muestras presentaron niveles superiores de aflatoxina B₁ a los límites permisibles por la Unión Europea para el consumo directo del maní. Las concentraciones de las aflatoxinas B₂, G₁ y G₂ cumplieron con los límites de control; sin embargo, un 42% de las muestras que presentaron contaminación de aflatoxinas superaron el límite permisible por la FAO para aflatoxinas totales.*

Tanto el maíz como el maní son insumos que se utilizan para la elaboración de balanceados de alimentación animal, en la gran mayoría de dietas de nutrición del ganado lechero está presente el maíz por su aporte calórico, sin embargo si las condiciones de cosecha, almacenamiento, procesamiento y/o transporte de este insumo no son las adecuadas podría constituirse en un riesgo para ganado y para el consumidor de la leche de su producción.

1.3. ABSORCIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE LAS AFLATOXINAS EN EL ORGANISMO ANIMAL.

La AFB1 es absorbida vía tracto gastrointestinal, dentro del sistema portal sanguíneo y es llevada para el hígado donde se metaboliza. Una porción de aflatoxina es activada y fijada en los tejidos hepáticos. Algunos metabolitos conjugados de la AFB1 solubles en agua son excretados dentro de la bilis y van a las heces. Otras formas conjugadas solubles en agua, productos de degradación de la AFB1 y metabolitos no conjugados de ésta, son excretadas en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen de forma sistémica. Eventualmente, esos residuos van a la leche, huevos, músculo y tejidos comestibles. La AFM1 es uno de esos derivados metabólicos. El organismo animal produce generalmente estos productos metabólicos como un sistema de autodesintoxicación. La reacción que tiene lugar a partir de la micotoxina original no tiene forzosamente que ser completa ni irreversible. (Rendon, N., 2007)

Los parámetros que afectan al nivel de residuos de micotoxinas en animales son:

- Especies y raza de los animales.
- Concentración de micotoxina.
- Cantidad y duración del consumo de alimento contaminado.
- Estado de salud del animal.
- Período que transcurre desde la retirada del alimento contaminado a la toma de muestras para el análisis de residuos.

La relación que existe entre la cantidad de alimento contaminado que ingiere el animal y la cantidad de AFM1 que se excreta por la glándula mamaria de una vaca lechera oscila entre 34:1 y 1600:1. El tiempo para que la vaca transforme la AFB1 en AFM1 puede ser después de las 12 a 24 horas de ingestión del alimento contaminado, inclusive a las 6 horas ya se podrían encontrar trazas de AFM1 en la leche, dependiendo del sistema metabólico poligástrico de cada animal lo cual hace que en cada uno sea diferente e inclusive en cada día también exista diferencia de concentraciones. (Gimeno y Martins 2003).

1.4. CONSECUENCIAS PARA LA SALUD PÚBLICA.

La ingesta de aflatoxinas en dosis bajas, medias o altas causan efectos tanto de corta duración (agudos), como aquellos que pudieran durar meses o años (crónicos). Entre las principales manifestaciones asociadas a la exposición de estas sustancias, están el daño hepático y renal, mutagénesis, teratogénesis, carcinogénesis, inmunosupresión y citotoxicidad, hasta causar la muerte. (Armijo, J., & Calderón, J. 2009).

Las aflatoxinas son inmunosupresoras ya que inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica (los anticuerpos son proteínas) interrumpiendo la formación del ADN, ARN y proteínas en el ribosoma; la absorción de los aminoácidos se ve alterada y su retención hepática aumenta, (Caballero, A. 2008).

La reacción de la AFM1 en cada individuo es diferente, depende de cada organismo, de la sinergia, la cantidad de ingestión diaria, la concentración de la AFM1, la frecuencia de ingestión del producto contaminado, el peso del individuo, el estado físico y de salud, la edad, sobre todo porque los niños y los jóvenes tienen mayor susceptibilidad por la variación del metabolismo basal, y la falta de defensas para desintoxicar su organismo, la AFM1 afecta al sistema nervioso y los niños tienen un continuo desarrollo cerebral que puede verse afectado.

Las micotoxinas por lo general son termoestables, sin embargo existen estudios referentes a la termoestabilidad de la AFM1 que indican a pesar de haber realizado tratamientos térmicos de hasta 100°C por el tiempo de 20 minutos o calentamientos directos de hasta 4 horas, no se han alterado o disminuido las concentraciones de contaminación de AFM1 en la leche tratada. Han existido reducciones hasta del 35% del contaminante toxigénico en tratamientos de 120°C por 30 minutos.

Las aflatoxinas son inodoras, insípidas e incoloras. Químicamente, son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales. Es difícil eliminarlas una vez que se producen. (Urrego, N. et al 2006).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cancer (IARC), clasifica a las aflatoxinas B1 y M1 como cancerígenos, es por esta preocupación de carácter mundial que se han establecido normativas de regulación alimentaria referente a los límites máximos permitidos de la AFM1, en algunos países, aunque en el Ecuador no existen estudios de incidencia y niveles de contaminación con AFM1 que permitan establecer estos límites con un criterio más acorde a la realidad de nuestro país.

Los límites de Aflatoxina M1, establecidos como máximos permitidos en la leche están entre los 0,5ug/kg y los 0,05ug/kg, como podemos observar un resumen en el siguiente cuadro:

LÍMITES MÁXIMOS PERMITIDOS DE AFLATOXINA M1 EN LECHE, SEGÚN LA LEGISLACIÓN DE AMERICA LATINA, U.S.A. Y EUROPA		
PAIS	LMR EN LECHE	FUENTE
ECUADOR	0,5ug/kg	NTE INEN 9 REQUISITOS LECHE CRUDA 2012
MERCOSUR	0,5ug/kg	REGLAMENTO TÉCNICO MERCOSUR SOBRE LÍMITES MÁXIMOS DE AFLATOXINAS ADMISIBLES EN LECHE, MANÍ Y MAÍZ (DEROGACIÓN DE LA RES. GMC Nº 56/94)
UNION EUROPEA	0,05ug de AFM1/lt o kg de leche. (0,05ppb)	OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION 2003
ESTADOS UNIDOS FDA	0,5ppb	EHSO; U.S. FDA,2000; CAST, 2003
COLOMBIA	0,4ug/kg	ICONTEC

Cuadro N° 1. Regulación de los LMR de aflatoxina M1.

Con esta preocupación de salud mundial, se han realizado algunos estudios de investigación como por ejemplo en México de 9 muestras de leche cruda, 20 de leche pasteurizada y 15 muestras de leche orgánica, el 59 % de las muestras presentaron niveles de aflatoxina M1, y todos los casos se encontraron por encima del límite máximo de residuos 0,05ug/kg, se encontró 16,21 ; 16,1 ; 23,1 ug/kg respectivamente. (Pérez, J.,et al. 2008).

En un estudio realizado en Bogotá se tomaron 29 muestras del suplemento para el ganado y 20 muestras de leche en 20 fincas de producción lechera, de los análisis del suplemento, el 44,8% resultó contaminada con aflatoxina en un nivel promedio de 16,3ppb. Del total de muestras contaminadas el 15,3% superó los límites máximos recomendados por la

normativa colombiana y la FDA de 20ppb para alimentos. De las 20 muestras de leche para el análisis de aflatoxina M1, el 100% de muestras mostraron contaminación con aflatoxina m1 en niveles que oscilaron entre 8,5 - 327,9 ppt. La mayor incidencia de contaminación, el 75%, osciló entre 8,5ppt - 68,9ppt. A pesar de que ninguna de las muestras mostró niveles de contaminación por encima de las recomendadas por la normativa colombiana (ICONTEC), de 0,4ppb y/o 400ppt, si hubo un 45% que mostró niveles de contaminación por encima de los límites máximos tolerados por la Unión Europea, que permite hasta el 0,05ppb y/o 50ppt. (Vásquez, 2006)

En un estudio realizado en México, se tomaron 9 muestras de leche cruda, 20 muestras de leche ultrapasteurizada, y 15 muestras de leche orgánica, para determinar la ocurrencia de aflatoxina m1, empleando una columna de extracción de la fase sólida (C18), prederivatización con ácido trifluoracético y cromatografía líquida acoplada a un detector fluorescente, y se determinó que el 59 % de las muestras presentaron niveles de aflatoxina m1 y todos los casos se encontraron por encima del límite máximo de residuo de la UE 0,05ppb. (Pérez et al 2008)

Mientras que en un estudio que evaluó los niveles de aflatoxina m1 en 48 muestras de leche orgánica producida en Chiapas, México, se mostró que el 23,3% de las muestras presentaban niveles de aflatoxina por encima de la normativa mexicana, 0,5ppb, y el 62,7% de las muestras demostraron niveles superiores a los permitidos por la UE de 0,05ug/kg. (Gutierrez et al 2013)

Se realizó un estudio en Colombia, en donde se tomaron 27 muestras de quesos frescos para detectar la presencia o ausencia de Aflatoxina M1 mediante la técnica de ELISA utilizando el kit comercial Ridascreen aflatoxina M1 30/15, de las cuales el 67% de las muestras analizadas arrojaron valores de aflatoxina M1 superiores a 240ppt. (Aranguren y Arguelles 2011).

Como un aporte a la seguridad alimentaria de los consumidores de leche del Ecuador, en especial a los niños y adultos mayores, es de primordial importancia ejecutar estudios de investigación que indiquen la presencia y/o ausencia de la AFM1 en la leche, como uno de los mayores riesgos contaminantes que pueden afectar a la salud pública.

2. CONTAMINACIÓN DE PRODUCTOS LACTEOS POR ANTIBIÓTICOS.

La aplicación de tratamientos terapéuticos a base de antibióticos se convierte en un riesgo debido a que el fármaco administrado al animal se distribuye por todo el organismo y se elimina por las vías urinarias, heces y las glándulas mamarias durante algunos días o por

el lapso de algunos ordeños dependiendo del tipo, la concentración y la dosis del fármaco utilizado; de esta manera se contamina el producto lácteo secretado por la glándula mamaria y éste debe ser eliminado durante el tiempo de retiro que se especifique en la etiqueta del fármaco utilizado. Es por eso que la legislación nacional de insumos veterinarios basada en la Decisión de la CAN 483, establece como obligatorio que se especifique en cada fármaco el tiempo de retiro que indica el número de días que el producto será eliminado por la glándula mamaria post tratamiento, y por lo tanto la leche ya no es apta para el consumo humano, para ello, es necesario aplicar métodos terapéuticos basados en conocimientos técnicos científicos de los procesos fisiológicos normales y anormales de los animales, y de la farmacología de cada medicamento utilizado,

Las pérdidas económicas que conciben la eliminación del producto durante el tiempo de retiro después de aplicar un fármaco son el mayor riesgo para el consumidor, hacen que se den las prácticas fraudulentas de mezclar la leche buena con la que contiene residuos de antibióticos y por falta de políticas de vigilancia y control en nuestro país, llegan a ser comercializadas y procesadas afectando la salud del consumidor.

2.1. ANTIBIÓTICOS.

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos, y originan su destrucción. Aunque los antibióticos están constituidos por clases muy diversas de compuestos, a menudo se clasifican en diferentes grupos. (*Cué B., & Morejón G., 1998*)

Los fármacos son generalmente administrados a los animales por un lapso de 1 a 7 día en dosis altas, con la finalidad de aplicar un tratamiento preventivo o curativo de enfermedades infecciosas. Y en otros casos algunos antibióticos son utilizados en dosis bajas durante períodos largos de la vida del animal, en el alimento para estimular su crecimiento.

2.2 RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS.

Gancho B. et al, manifiesta que los residuos de cualquier medicamento veterinario son sustancias farmacológicamente activas, ya sean principios activos, excipientes o bien productos de degradación y metabolitos que permanecen en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les ha administrado el medicamento veterinario. Después de administrar un medicamento a un animal, tiene lugar un proceso metabólico que favorece su excreción por la orina y las heces; sin embargo, también se pueden encontrar estos productos en la leche o en la carne después de sacrificar el animal.

Uno de los principales problemas infecciosos que afectan al ganado lechero es la presencia de infecciones bacterianas en la glándula mamaria llamada mastitis, que en algunos casos cuando se trata de mastitis clínica o subclínica, se requiere de un tratamiento curativo a base de antibióticos como la Penicilina (betalactámico) que se administra al animal tanto por vía parenteral o intramamaria. Cuando se introduce un antibiótico en la ubre, éste se distribuye en el tejido mamario por los conductos galactóforos y es transferido al torrente sanguíneo por un mecanismo físico químico que depende del valor de pK del preparado, valor del pH del plasma sanguíneo, proteína ligada al antibiótico y valor de pH de la leche. Debido a esto, la reabsorción del producto es muy variable de acuerdo al preparado y al animal. , (*Magariños, H. 2000*).

De la dosis administrada a la glándula mamaria, una parte es absorbida pasando al torrente sanguíneo, otra es inactivada por la leche y los productos generados por la infección y el resto, que es la mayor parte, es excretada a la leche durante los ordeños posteriores. Existe una correlación negativa entre el tiempo de eliminación del antibiótico y el volumen de leche producido por el animal. Los animales de baja producción demoran en excretar el preparado, principalmente por la mala absorción y secreción de los cuartos afectados. El ordeño frecuente aumenta el efecto de dilución y por lo tanto acorta el tiempo de eliminación del antibiótico. Por otra parte, no sólo la leche de los cuartos tratados es la que se contamina. Se ha podido comprobar, en algunos casos, actividad antibiótica en los cuartos vecinos no tratados, actividad que permanece, por lo general, durante un período de tiempo igual a la mitad del observado para los tratados. Es posible que esta situación se produzca por difusión pasiva entre la sangre y la leche y también por difusión directa entre los tejidos mamaros

En un estudio, *Magariños* manifiesta que la leche de un animal tratado con 200mg de penicilina G, es capaz de contaminar la leche de 8000 vacas, si no se aplica la práctica de retiro y separación de la leche contaminada; y que aún persiste la creencia errónea de que los tratamientos térmicos a los cuales se somete la leche destruyen las sustancias inhibitoras y, en forma particular, los antibióticos, menciona también que algunos estudios indican que la penicilina pierde solamente un 8% de su actividad luego de la pasteurización, pues un tratamiento térmico más exigente (90°C por 30 minutos), destruye el 20% de la actividad de la penicilina y la esterilización un 50%.

2.3. TIEMPO DE RETIRO.

Para garantizar que la concentración residual de los antibióticos no sea superior a su correspondiente límite máximo residual, es necesario establecer un tiempo de espera. Este tiempo de espera es el plazo de tiempo que debe transcurrir, y debe ser respetado desde el último tratamiento farmacológico hasta el sacrificio de los animales para poder consumir

la carne o recoger sus productos (leche, huevos) para su comercialización. Estos tiempos se determinan en función del perfil cinético de la eliminación tisular de los fármacos (inalterado y/o metabolitos) en los animales. Cada antibiótico debe ir acompañado de un prospecto en donde conste el valor del tiempo de espera. No cumplir estas indicaciones supone un riesgo para la salud de los consumidores y el peligro de incurrir en infracciones penales para quien así lo realice, mencionan Gancho, B., et al (2000)

2.4 RIESGOS PARA LA SALUD.

Uno de los problemas que ocasiona en el ser humano el antibiótico presente en la leche son las reacciones de tipo alérgico que se producen luego de un período de sensibilización, en el cual se generan en el sistema retículo endotelial de anticuerpos contra la droga administrada que actúa como antígeno. El contacto con los antígenos, continuado o periódico, provoca la reacción alérgica que resulta desproporcionada con la dosis ingerida. (*Magariños, H. 2000*).

Parra, T., et. al presenta algunos efectos que además de las reacciones alérgicas pueden causar los residuos de antibióticos en el consumidor, tales como:

- alteración de la flora intestinal, (amino glucósidos)
- estimulación de bacterias antibiótico-resistentes,
- desarrollo de microorganismos patógenos,
- reducción de la síntesis de vitaminas.

Mientras que autores como *Gancho, B.*, menciona los problemas de osificación y dentición que confrontan los niños en crecimiento con residuos de tetraciclinas en su alimentación, y respecto de la penicilina indica que se han dado casos en los que personas sensibles experimentan reacciones alérgicas por el consumo de residuos presentes en carne o leche, estimándose que 10UI (0,6 ug) pueden causar reacciones como prurito general, dificultad para tragar y hablar, disnea, dermatitis por contacto y urticaria. Aunque los residuos solo se encuentren en los alimentos en muy baja concentración, es posible que la ingestión regular de pequeñas cantidades, de una misma sustancia, pueda determinar manifestaciones tóxicas, a largo plazo, por efectos acumulativos. Los efectos tóxicos pueden agruparse en directos e indirectos. Son efectos directos, aquellos producidos por la utilización de antibióticos, en condiciones terapéuticas, éstos se manifiestan en variadas formas clínicas como: toxicidad en el riñón, hígado, sangre, médula ósea, efectos teratogénicos, carcinogénicos y alergias graves. Los efectos indirectos se relacionan con los fenómenos de resistencia bacteriana.

Existen casos de tratamiento clínicos con experiencia en un individuo que generan expectativas de curación y sin embargo no causan ningún efecto sobre el paciente por el fenómeno de la resistencia a los medicamentos de microorganismos patógenos de los animales al hombre. Muchos microorganismos patógenos como por ejemplo la **Salmonella**, adquieren resistencia múltiple al ser sometidos a bajas concentraciones de antibióticos, lo cual representa un serio peligro potencial para el ser humano

Este tipo de riesgos para la salud motiva la investigación en esta rama para verificar la presencia y/o ausencia de contaminantes fármacos y contribuir en políticas de control, vigilancia y monitoreo.

En diferentes estudios se observan resultados como: En la ciudad de Riobamba- Ecuador, en un estudio de Díaz, se demuestra la presencia de residuos de antibióticos en el 50% de 22 muestras de leche procesada de las marcas más comerciales de esa ciudad. Díaz C (2008).

En un estudio realizado en México, de 264 muestras analizadas mediante la prueba del yogurt, el 9,8 % demostró contaminación con antibióticos. Es decir, fueron 26 resultaron positivas a la presencia de antimicrobianos de las cuales 20 muestras positivas (13,8%) eran de leche pasteurizada y 6 muestras o el 5%, era de leche cruda. De las 20 muestras de leche pasteurizada positivas, 6 eran de trazas de betalactámicos y 2 de tetraciclinas. Y de las 6 muestras positivas de leche cruda 3 eran positivas a betalactámicos y 3 a tetraciclinas. Y del total de las muestras positivas el 77% contenía residuos de sulfonamidas.

La mayoría de los estudios de concentran en betalactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas debido a su uso en la actividad pecuaria y a la mayor sensibilidad a las penicilinas de los métodos de detección existentes en el mercado.

Es por ello que el desafío para el sector lechero no sólo es producir mayor cantidad de leche sino también de alta calidad higiénica, y para ello deben contemplarse aspectos fundamentales, como son la higiene microbiológica, higiene química e higiene estética. Tres aspectos que, unidos, pueden contribuir favorablemente a la mejora del sector lechero de nuestro país, con el beneficio consecuente en el desarrollo físico e intelectual de las generaciones venideras.

Debido a sus variados efectos tóxicos y a su alta resistencia a los tratamientos térmicos, la presencia de micotoxinas y antibióticos en los alimentos es potencialmente peligrosa para la salud humana. El riesgo para la población de adquirir la leche fresca o sus derivados contaminados es constante, existe la necesidad de tener mayor información sobre la incidencia de contaminación con este tipo de sustancias que circulan en el mercado y que

indiscriminadamente son utilizados en las ganaderías. La falta de información sobre la ocurrencia de este tipo de adulteración en la leche cruda limita las políticas de vigilancia, monitoreo y control.

Debido a todos los riesgos que representan para la salud pública el consumo de leche contaminada con residuos de antibióticos, se han establecido normativas que establecen los límites máximos permitidos en la leche según se detalla en el siguiente cuadro.

NORMATIVAS QUE ESTABLECEN LOS LIMITES MÁXIMOS PERMITIDOS DE ANTIBIOTICOS EN LECHE PARA CONSUMO HUMANO Y SENSIBILIDAD DEL MÉTODO DE ENSAYO UTILIZADO EN EL PRESENTE ESTUDIO				
TIPO DE ANTIBIÓTICO	LMR CAC/LMR 2-2012 CODEX ALIMENTARIOS INEN 9: LECHE CRUDA	LMR UE REGLAMENTO UE 372010	CHILE RESOLUCIÓN EXENTA Nº 1462 DE 1999	SENSIBILIDAD DEL METODO DE DETECCIÓN UTILIZADO (TRISENSOR Y TRIAMINOSENSOR)
BENCILPENICILINA	4ug/l	4ug/l	4ug/l	2-3ug/kg
TETRACICLINAS- OXITETRACICLINAS	100ug/l	100ug/l	100ug/kg	80-100ug/kg 50-60ug/kg
SULFADIMIDINA	25ug/l	100	25ug/l	5 - 6ug/l
ESTREPTOMICINA	200ug/l	200ug/l	200ug/l	150-250ug/l
GENTAMICINA	200ug/l	100ug/l	200ug/l	3-5ug/l
NEOMICINA	1500ug/kg	1500ug/l	500ug/l	15-25ug/l

Cuadro N.º 2. Regulación de los LMR de antibióticos en leche y su relación con la sensibilidad del método de detección utilizado en el presente estudio.

En base a este sustento teórico, la presente investigación se desarrolla para lograr los siguientes objetivos:

- Detectar cualitativamente la presencia de aflatoxina M1 en los hatos ganaderos de alta producción lechera del cantón Biblián.
- Detectar cualitativamente la presencia de antibióticos amino glucósidos, betalactámicos, sulfas y tetraciclinas de la leche cruda de las fincas más grandes del cantón Biblián
- Analizar la incidencia de la contaminación con antibióticos, según el tipo de fármaco, la finca y la zona.

CAPÍTULO I

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. ÁREA DE ESTUDIO.

De conformidad con la información del Sistema Oficial de la Fiebre Aftosa en el Ecuador (SIFAE 2012), de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad de Agro, AGROCALIDAD de la provincia del Cañar, se conoce que en el cantón Biblián existe un total de 22 fincas con 50 o más animales, determinando en esta forma las fincas de mayor producción lechera de la zona, con características similares tales como: número de animales, manejo semitecnificado, alimentación a base de concentrado (balanceado y/o mezclas de granos), etc. Es por ello, que en la presente investigación se seleccionó el 100% de las fincas con 50 o más animales ubicadas en el cantón Biblián, con la mayor producción lechera del sector. (Véase el listado de fincas del estudio en el Anexo 1).

Se consideró la ubicación de las 22 fincas y se dividió el área de estudio en 3 zonas en función de las principales rutas de producción de leche del cantón: Zona 1: Burgay, Jerusalén y La Carmela; Zona 2: El Bueste, Mosquera y Aguarongo; y la Zona 3: La Ponderosa y Jabaspamba. (Véase distribución de las fincas por zona en el Anexo 6)

1.2. TOMA DE MUESTRAS.

Desde el mes de abril hasta julio del año 2013, se ejecutó el estudio en las 22 fincas, y en cada una se realizaron dos visitas para la toma de muestras con un intervalo de 7 días, (lapso determinado según la información del tiempo promedio de rotación de balanceado obtenido a través de encuestas en cada finca). (Ver formato de la encuesta en el Anexo 2). En total se colectaron 88 muestras de leche cruda, de las cuales se realizaron los análisis respectivos para detectar presencia y/o ausencia de Aflatoxina M1, y de Antibióticos betalactámicos, sulfas, tetraciclinas y aminoglucósidos.

Para realizar la colecta de las muestras, se adaptó la metodología establecida por: Taverna, M., et al. 2005 y se procedió según se detallada a continuación:

PROCEDIMIENTO		MATERIALES
1	Preparación de instrumentos y utensilios	-Agitador y cucharón saca muestras de acero inoxidable, termómetro, envases, rociador con alcohol, fosforera, elementos varios (toallas de papel descartable, desinfectante, linterna.)
2	Desinfección de los utensilios, rociando el alcohol y flameando con fuego	Alcohol, rociador, y fosforera
3	Introducción del agitador hasta el fondo del tanque, y levantándolo para que se originen movimientos de la leche desde el fondo hasta arriba. Se repite la operación al menos 6 veces o 30 segundos	Agitador
4	Medición y registro de la temperatura directamente en la cantarilla, en 1 tacho al azar cada 5 existentes. Si fueran 5 o más se medirá en 2 tachos elegidos al azar.	Termolactodensímetro
5	<ul style="list-style-type: none"> - Se deberá introducir el cucharón dos veces en la leche volcando el contenido dentro del mismo tacho - Extraer la muestra introduciendo el cucharón como mínimo 15 - 20 cm por debajo del nivel de leche del tacho. -Volcar el contenido del cucharón dentro del envase hasta que se colecte 400 ml evitando derrames. -Una vez colectada la muestra de 400 ml se deberá colocar esta leche en un envase de plástico de 100 ml que deberá ser cerrado herméticamente para su transporte refrigerado y análisis en las dos horas posteriores a su colecta 	<ul style="list-style-type: none"> - Cucharón saca muestras - Jarra de 500 ml - Envase de plástico de 100 ml

6	<p>Identificación de las muestras, en envase de 100 ml que deberán estar secos y limpios antes de adherir la etiqueta. Se utilizará escritura indeleble. Se colocará etiquetas de colores referenciales para cada análisis, (Amarillo-aflatoxina/ azul-trisensor / verde-aminoglucosidos).</p> <p>Se deberá asentar en el documento correspondiente cualquier observación surgida durante el transcurso del muestreo.</p>	<p>-Adhesivos de colores, amarillo, azul y verde</p> <p>-Marcador indeleble</p> <p>-Registro con el número de identificación de cada muestra</p>
7	<p>Conservación de la muestra, colocando cada recipiente de plástico en un cooler con suficientes geles refrigerantes, (8-10) que mantengan la temperatura menor a 10°C. Tomando en cuenta que la conservadora (cooler) permanezca cerrada.</p>	<p>-Un cooler o conservador</p> <p>-Geles refrigerantes</p>
8	<p>Lavado y guardado de material, se deberá lavar, enjuagar y secar el material utilizado para luego colocar el material limpio y seco en el lugar correspondiente</p>	<p>-detergente</p> <p>-caja portátil de materiales</p> <p>-toallas desechables</p>
9	<p>Transporte de la muestra al destino final verificando que la conservadora (cooler) se encuentre en el lugar apropiado y controlando que se disponga de la documentación correspondiente. Para iniciar con los análisis durante las 2 horas posteriores a la colecta</p>	<p>-termómetro para controlar la temperatura del conservador.</p>

CUADRO N°. 3. Procedimiento para la colecta de muestras en campo.

Con esta metodología se visitaron dos veces a cada finca, y se tomaron 2 muestras en cada finca por visita. Todas las muestras se colectaron desde las 04h30 hasta las 08h00h, durante los 30 minutos posteriores al ordeño de la mañana de cada finca. (Ver Anexo 3)



Figura N°. 2. Toma de muestras



Figura N°. 3. Muestras de leche



Figura N°. 4. Refrigeración para transporte de muestras

Previo al muestreo se realizó una encuesta a propietarios y/o administrador de cada finca para obtener información sobre la alimentación, conservación de los alimentos balanceados, los nombres de los fármacos más utilizados, y los nombres de las enfermedades más comunes.

1.3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.

Se realizaron tres tipos de análisis:

1. - Detección de la presencia o ausencia de aflatoxina M1 con el Test Snap Aflatoxina M1 en muestras de leche cruda.
2. - Detección de la presencia o ausencia de Antibióticos de las familias Betalactámicos, Sulfamidas y Tetraciclinas con el Test Trisensor en muestras de leche cruda
- 3.- Detección de la presencia o ausencia de Antibióticos de la familia de amino glucósidos como: Gentamicina, Streptomycina y Neomycina con el Test Triaminosensor en muestras de leche cruda

1.3.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE AFLATOXINA M1.

Para determinar la presencia de aflatoxina M1, se analizaron las 88 muestras mediante la técnica de ELISA de detección inmunoenzimática, con el test SNAP AFLA (INDEX LABORATORIOS)

La prueba ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. Durante los últimos 20 años, la importancia y aplicaciones de inmunoensayos ha crecido significativamente. Los ensayos ELISA son adecuados para ensayos rápidos y proveen adecuada sensibilidad. Además se trata de métodos efectivos, de bajo costo y que requieren poco volumen de muestra para el análisis (Pei *et al.*, 2009)

Se empleó el test cualitativo Snap® Aflatoxin M1 (IDEXX Laboratorios, EEUU), Lote No. JH681 Part No: 99-24964, (fecha de expiración 26/oct/13) que tiene un nivel de sensibilidad de 0.50 ppb. Esta prueba detecta aflatoxina M1 (AFM1) a concentraciones iguales o inferiores a los niveles de acción establecidos por la Administración de Alimentos y Fármacos (Food and Drug Administration, FDA) de los EE. UU y a los niveles establecidos en la normativa ecuatoriana que establece un máximo de 0,5 µg/kg de Aflatoxina M1.

Es Snap® Aflatoxina M1 es un Test de inmunoensayo enzimático cualitativo, es decir se basa en la reacción Antígeno - Anticuerpo (Ag -Ac).

Para realizar la prueba se requiere de los siguientes materiales que constan en el kit

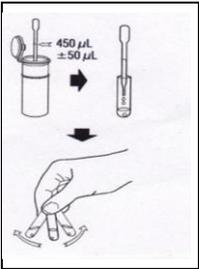
- Dispositivo SNAP
- Tubo de muestra y la tapa
- Reactivo pellet
- Pipeta

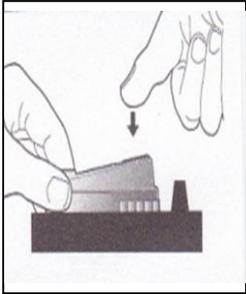
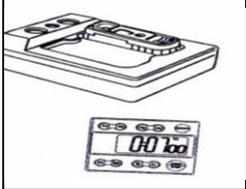
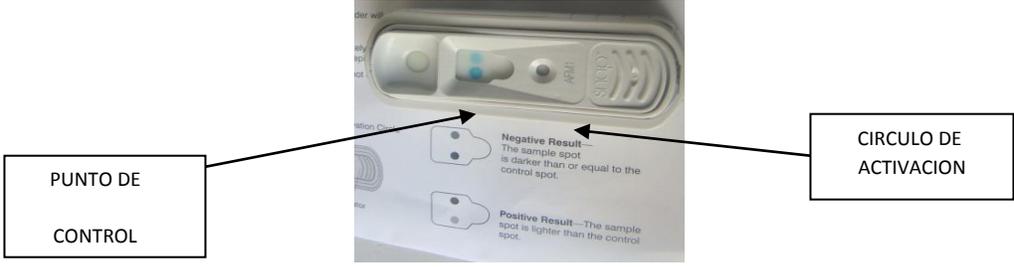
Además, se debe utilizar un bloque calentador capaz de mantener una temperatura de funcionamiento de 45 ° C de manera obligatoria para todas las pruebas.

Para iniciar el análisis se deben preparar las muestras de la siguiente manera:

- Asegurarse de que el kit a utilizar se mantuvo almacenado a una temperatura de 2° C – 8 ° C
- Asegurarse que la muestra de leche esté a una temperatura de 0° C a 10° C
- Asegúrese de que el bloque del calentador está previamente atemperado y ha mantenido una temperatura de 45 ° C durante al menos 5 minutos.

Para la ejecución del análisis se siguieron todas las instrucciones del fabricante detalladas a continuación en los siguientes pasos:

N°	INSTRUCCIÓN	
1.	Retire el dispositivo SNAP, pipeta y tubo de muestra de la bolsa de aluminio.	
2.	Coloque el dispositivo SNAP en el bloque del calentador precalentado, durante toda la prueba	
3.	Agite la muestra de leche.	
4.	Retire y deseche la tapa del tubo de muestra.	
5.	Con la pipeta IDEXX, tomar la muestra de leche ($450 \mu\text{l} \pm 50 \mu\text{l}$) desde la mitad del frasco, poco a poco hasta la línea indicadora de la pipeta para evitar las burbujas de aire.	
6.	Añadir cuidadosamente toda la muestra de leche a partir de la pipeta al tubo.	
7.	Agitar el tubo de muestra para disolver el reactivo de pellets.	
8.	Incubar el tubo de muestra en el bloque de calentamiento a 45°C (113°F) $\pm 5^\circ \text{C}$ durante dos minutos	
9.	Colocar el contenido del tubo de muestra en el pocillo de muestra del kit SNAP y desechar el tubo	

<p>10.</p>	<p>La muestra fluirá a través de la ventana de resultados hacia el círculo de activación central verde. En el momento que se encuentre el círculo de activación con la mitad del círculo descolorido, debe aplastar el dispositivo.</p>	
<p>11.</p>	<p>Espere durante 7 minutos con el dispositivo colocado en el calentador</p>	
<p>12.</p>	<p>Dar lectura a los resultados: POSITIVO: el punto de control es de un color más intenso que el spot de la muestra NEGATIVO: el punto de control tiene un color menos intenso o igual al del spot de la muestra</p>	

Cuadro N°. 4. Procedimiento para realizar la prueba de Aflatoxinas.

1.3.2. ANÁLISIS CUALITATIVO DE ANTIBIÓTICOS.

Se realizaron dos tipos de análisis para detectar la presencia de antibióticos, utilizando pruebas con técnicas inmunoenzimáticas.

Test Trisensor: prueba rápida que le permite detectar simultáneamente la presencia tanto de antibióticos Betalactámicos, las moléculas de sulfamidas y tetraciclina en una muestra de leche. Se utilizó el kit 035, Lote 123051 con fecha de expiración 21 de abril del 2014

Test Triaminosensor: prueba rápida que le permite detectar simultáneamente la presencia de antibióticos Aminoglucósicos, las moléculas de Neomicina, Estreptomycin, y Gentamicina en una muestra de leche. Se utilizó el kit 048, Lote 12325B con fecha de expiración 16 de octubre del 2013

Los dos tipos de Test tienen el mismo mecanismo de reacción, con una tira reactiva multiplex con un flujo lateral (LF) de ensayo utilizando receptores específicos y anticuerpos monoclonales genéricos. Es un tipo de inmunoensayo competitivo que implica dos receptores y anticuerpos monoclonales genéricos en una sola operación.

Las pruebas requieren el uso de dos componentes. El primer componente es un micropocillo que contiene predeterminadas cantidades de ambos receptores y anticuerpos unidos a partículas de oro. La segunda es una tira reactiva compuesta por un conjunto de membranas con líneas de captura específicas. Para una prueba válida, la línea de control roja superior tiene que ser visible después de la segunda de incubación. Los otros tres son las líneas específicas de "cada prueba" colocados por debajo de la línea de control. En el caso de Trisensor La línea de Betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas) se encuentra por debajo de la línea de sulfamida mientras que la línea relativa a las tetraciclinas se encuentra por encima de ella. (Véase Anexo 4)

Mientras que en la prueba Triaminosensor la línea de Neomicina se encuentra por debajo de la línea de Estreptomycina, mientras que la línea relativa a la Gentamicina se localiza por encima de ella. Cuando el reactivo de la microplaca se resuspende con una muestra de leche, tanto receptores y anticuerpos monoclonales se unirán a los analitos correspondientes si están presentes durante los primeros 3-minutos de incubación a 40 ° C. Después, cuando la tira reactiva se sumerge en la leche, el líquido empieza a correr verticalmente en la varilla de nivel y pasa a través de las zonas de captura.

Cuando la muestra está libre de antibióticos, un desarrollo de color se produce en las líneas de captura específicas, lo que indica la ausencia de los analitos específicos en la muestra de leche. Por el contrario, la presencia de antibióticos en la muestra no hará que la señal de color aparezca en cada una de las líneas de captura específicas. (KIT035_TRISENSOR_Milk, KIT048_TRIAMINOSENSOR_Milk 2010) (Véase Anexo 5)

Los materiales que se utilizaron para realizar estas dos pruebas son:

Un pocillo con reactivo, una varilla de inmersión, una micropipeta de 200ul, una hoja de instrucciones, un calentador o incubador de pocillos

Las pruebas se realizaron siguiendo el siguiente protocolo

- 1) Asegurarse que cada kit ha sido almacenado a una temperatura inferior a los 8° C
- 2) Asegurarse que la muestra de leche está en una temperatura inferior a 10 ° C
- 3) Colocar el incubador para que se precaliente hasta 40° C
- 4) Retirar el pocillo del frasco de cada kit
- 5) Añadir 200ul de leche en el pocillo con el reactivo

- 6) Incubar 3 minutos a 40 ° C,
- 7) Colocar una tira reactiva en el pocillo incubado
- 8) Continuar la incubación durante 3 minutos a 40 ° C,
- 9) Leer las líneas de prueba según las intensidades de color y compararlas con la línea de control para la interpretación de los resultados

Los resultados se visualizan en las 3 líneas de captura específicas por el uso de oro coloidal-conjugados. El tiempo de duración del análisis es de 6 minutos para correr y no requiere ninguna limpieza o preparación de la muestra. Es capaz de detectar (LD), las 3 familias de antibióticos en concentraciones cercanas a sus respectivos límites máximos de residuos (LMR), establecidos por la UE y relacionados con la normativa ecuatoriana y/o CODEX ALIMENTARIUS, y en Los resultados pueden obtenerse a través de la observación visual o con la ayuda de un lector óptico.

CAPÍTULO II

RESULTADOS.

2.1. DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1.

En cada finca existe una mediana de 62 bovinos con un promedio de producción diaria de leche de 549 litros, dando una producción total de 10642 litros de leche diarios en las 22 fincas que se distribuyen entre: Industrias lácteas procesadoras de queso locales, consumidores locales directos, industrias lácteas procesadoras de queso del cantón Cuenca, y centros de acopio de leche con destino a procesadoras de los cantones de Quito, Ambato y Guayaquil.

El sistema de ordeño en las 14 fincas es mecánico y en las 8 fincas realizan la práctica del ordeño manual, mientras que la forma de almacenamiento de la leche ordeñada es mediante tanques de enfriamiento en 6 fincas y en las 16 fincas almacenan el producto en recipientes de acero inoxidable hasta que los intermediarios transportistas lleven el producto a centros de acopio o al destino final.

En cuanto a la alimentación en 17 de las 22 fincas se suministra a los animales pasto y balanceado de marcas conocidas en la zona, de las cuales 5 fincas mezclan el balanceado con granos como cebada, avena, maíz, afrecho, soya, palmito, arrocillo en pequeñas proporciones. El almacenamiento del balanceado en las 19 fincas se realiza en bodegas de uso exclusivo para este fin. Se observa que de las 19 fincas que cuentan con bodegas, el 45% compra cada semana los sacos de alimento sea este balanceado o mezclas de granos, el 30% compra cada quince días, y el 25% de fincas compran el concentrado cada mes, por lo tanto estos períodos de tiempo son los que se conservan dichos alimentos en las bodegas de las fincas. Proveyendo exclusivamente a las vacas productoras de leche una ración promedio de 2,5 kg/día.

En estas 22 fincas, no se detectó presencia de Aflatoxina M1 de acuerdo con los resultados de los respectivos análisis.

2.2. DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS.

En cada finca se observa que los antibióticos más utilizados son: Penicilina, gentamicina, sulfadimidina, neomicina, sulfadoxina, oxitetraciclina, cefalosporina, ceftiofur, amoxicilina. Estos fármacos presentan un tiempo de retiro entre 72 – 288 horas después de haber terminado el tratamiento, y son manejados en su mayoría para el tratamiento de enfermedades infecciosas de los animales como: mastitis, panadizo, bronconeumonía, problemas respiratorios o retenciones placentarias.

De 88 muestras de leche cruda tomadas en las 22 fincas, y analizadas con métodos de inmunoensayo enzimático de las pruebas Trisensor y Triaminosensor, con niveles de sensibilidad iguales o inferiores a los límites permitidos por la UE y de acuerdo con la normativa ecuatoriana, se obtuvieron 17 resultados positivos a residuos de antibióticos, lo que equivale al 19% del total de las muestras de leche cruda, de las cuales 11 muestras presentan trazas de betalactámicos, 1 muestra presenta residuos de gentamicina y 5 muestras del antibiótico neomicina, dando un porcentaje de contaminación del 65% - 6% - 29% respectivamente.

De las 22 fincas productoras de leche cruda, las 10 presentan contaminación con trazas de antibióticos durante los días de muestreo realizado, de las cuales 6 fincas presentan residuos de Betalactámicos, 3 de Neomicina y en 1 se detectó presencia de gentamicina; según se detalla en el siguiente cuadro:

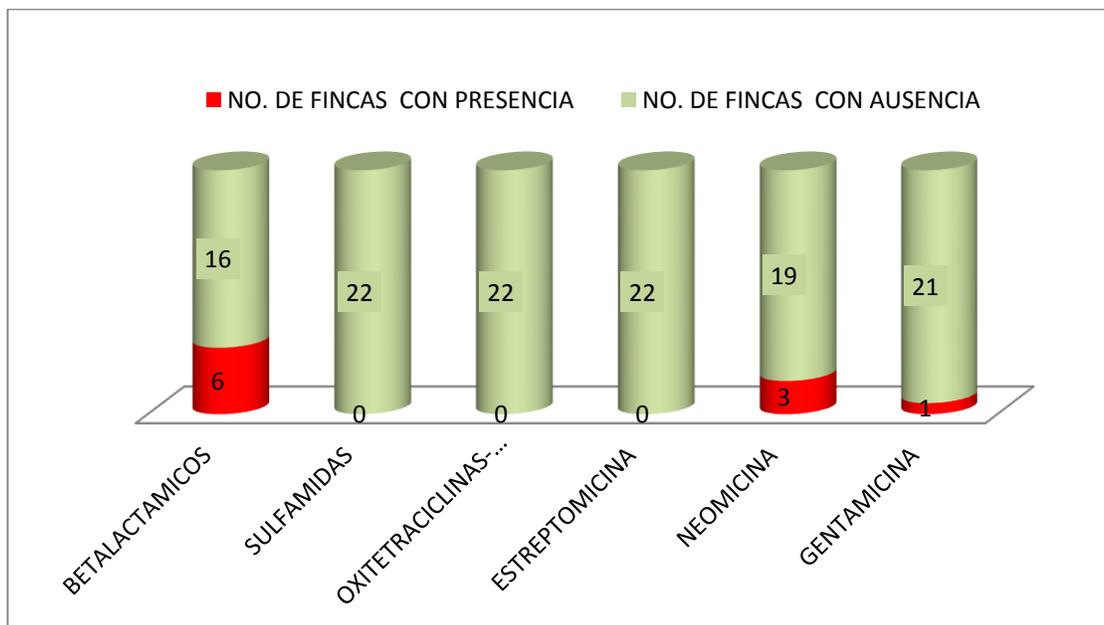


Figura N°. 5. Presencia de residuos de Antibióticos según el tipo de fármaco por finca.

Las 22 fincas se encuentran distribuidas en el presente estudio en 3 zonas según su situación geográfica, de las cuales 11 fincas están en la Zona 1, 5 fincas en la Zona 2, y 6 fincas están ubicadas en la Zona 3; la producción de leche cruda contaminada con trazas de antibiótico está distribuida en 4 fincas de la zona 1, 3 fincas de la zona 2 y 3 fincas de la zona 3.

Todo lo arriba manifestado y para una mayor y cabal comprensión se resume a continuación de manera gráfica.

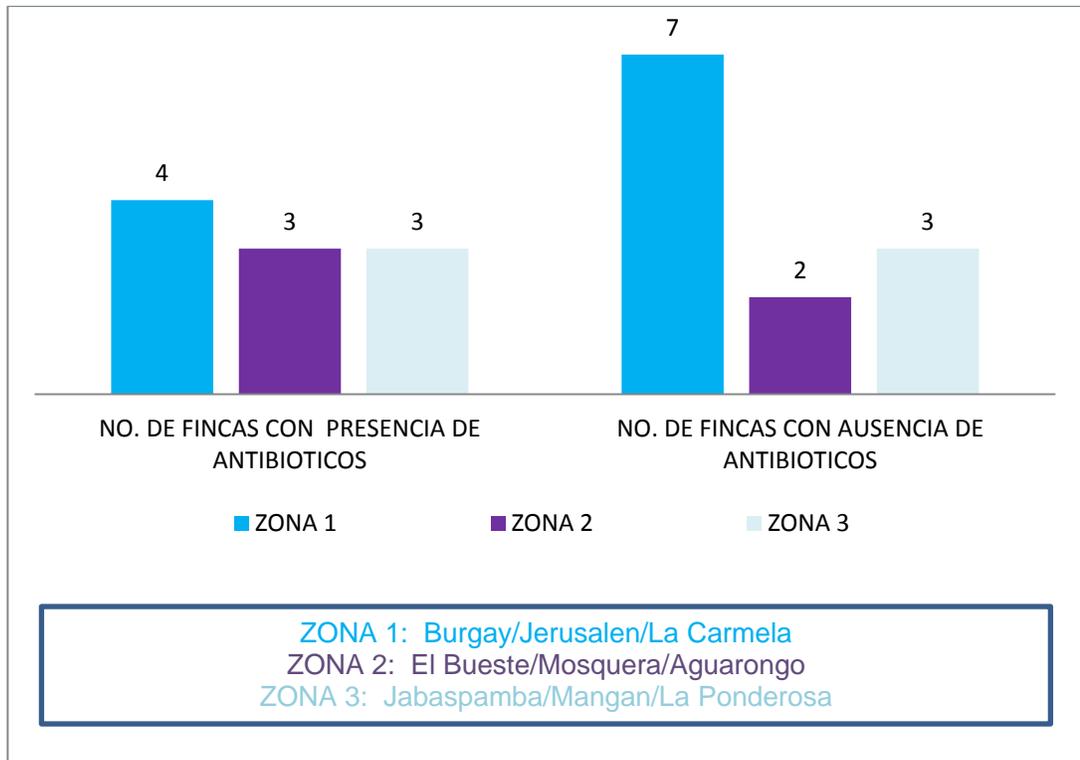


Figura N°. 6: Presencia de residuos de antibiótico según la zona.

En el Anexo 6, podemos apreciar el mapa de ubicación de las fincas estudiadas geográficamente divididas por cada zona.

CAPÍTULO III

DISCUSIÓN.

3.1. DETECCIÓN DE AFLATOXINAS.

Al analizar 88 muestras de leche cruda con el método enzimático de inmunoensayo, Snap Aflatoxina M1, (IDEXX Laboratorios, EEUU), que tiene un nivel de sensibilidad de 0.50 ppb, se revela ausencia de Aflatoxina M1 en el área y tiempo del presente estudio. Se debe considerar que el nivel de sensibilidad de la prueba utilizada es una concentración igual a los niveles de acción establecidos por la regulación ecuatoriana, NTE INEN 9: LECHE CRUDA REQUISITOS, que establecen un máximo de 0,5 µg/kg de Aflatoxina M1. en leche cruda y coinciden con la administración de Alimentos y Fármacos (Food and Drug Administration, FDA) de los EE. UU que establece un LMR de 0,5ppb, y con la regulación establecida en el MERCOSUR.

El análisis hecho en la provincia de Cañar, demuestra que la inocuidad, referente a la aflatoxina M1, de la leche en esta zona del Ecuador, es mejor controlada que en otros países como se puede observar en los estudios hechos por Vásquez (2006), en donde mostraron el 75% de contaminación de leche cruda con aflatoxina M1 de 20 muestras tomadas en Colombia, y analizadas según la regulación establecida por Colombia, que establece un LMR de 0,4ppb de aflatoxina m1 en leche. Más aún, si comparamos con la normativa establecida por la Unión Europea, encontramos más diferencia por la rigurosidad de sus límites máximos tolerables para aflatoxina M1 que permiten hasta el 0,05ppb en leche.

De igual manera el estudio de ocurrencia de aflatoxina M1 en 9 muestras de leche cruda realizado por Perez et al. en México demuestran niveles de aflatoxina M1 superiores a los límites establecidos por la Unión Europea, la FDA y la normativa ecuatoriana.

Existe ausencia de aflatoxina M1, en el presente estudio, probablemente debido a que en todas las fincas existe una rotación de balanceado frecuente y las condiciones de humedad y temperatura son bajas, sin favorecer la propagación de hongos y sus metabolitos, Sin embargo, se utilizan balanceados y granos de origen desconocido y las condiciones podrían variar frecuentemente, ya que estos insumos podrían venir de zonas cálidas con incidencia de contaminación.

En la Constitución de la República del Ecuador, existen derechos para el buen vivir, con una alimentación sana, en el artículo 13 se prescribe: *"las personas y las colectividades tienen*

derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local, y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales, para lo cual el Estado deberá promover la soberanía alimentaria. (Asamblea Nacional 2010). Sin embargo en nuestro país, aún no existen políticas de monitoreo y vigilancia permanente de aflatoxinas en la leche y/o balanceados que aseguren la salud de quienes consumimos este tipo de productos.

3.2. DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS.

Los resultados positivos a residuos de Antibióticos betalactámicos, gentamicina y neomicina encontrados en este estudio objetan con la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9 para leche cruda, revisión 2012, que establece los requisitos físicos, microbiológicos y químicos mínimos y máximos para la leche cruda para consumo humano. Esta Norma nos indica que los residuos de antibióticos permitidos en leche cruda no serán mayores a los límites máximos establecidos por el CODEX ALIMENTARIUS, cuya relación con la sensibilidad de los métodos utilizados en el presente estudio son válidos.

El hallazgo de 17 muestras positivas a antibióticos, de las cuales el 65% presentan residuos de betalactámicos y el 35% a los antibióticos aminoglucósidos, nos indican que el tratamiento de infecciones en el ganado así como la aplicación de antibióticos por diferentes causas en las fincas ganaderas, se estaría focalizando actualmente en los antibióticos del género betalactámico; hecho que puede relacionarse con la presencia de Mastitis, que es un problema de carácter infeccioso que se da por falta de condiciones higiénicas adecuadas durante el ordeño y que puede ayudar a dirigir políticas de legislación, regulación y capacitación.

El porcentaje de resultados positivos con residuos de antibiótico de este estudio, el 19% es inferior al resultado de otros estudios, como por ejemplo de Dániza M. et. al, quienes en 40 muestras de leche cruda comercializada en Callao, encuentran el 40% de resultados positivos a residuos de antibióticos betalactámicos y ausencia de tetraciclinas, cuya diferencia podría depender del número de muestras analizadas que es la mitad de este estudio, mientras que el porcentaje de resultados positivos es el doble. También el estudio de Díaz C. en Riobamba determina el 50% de resultados positivos a residuos de antibióticos en 22 muestras, con la diferencia de que analiza leches pasteurizadas y el número de muestras es la cuarta parte de las analizadas en el presente estudio. El estudio de Salas P. et al, demuestran en Perú el 45% de leche contaminada con residuos de antibióticos de 60 muestras analizadas, lo cual también es un porcentaje superior al presente estudio.

Mientras que al relacionar con la investigación del estudio de Máttar S. et al, en Colombia que presentan el 25 % de resultados positivos a residuos de antibióticos en 445 muestras analizadas, nuestro estudio presente mayor incidencia por el número de muestras analizadas.

La existencia de residuos de antibióticos en leche cruda permite entrever que, además de la regulación estricta en la comercialización de antimicrobianos, es necesario mantener la vigilancia constante, capacitación a todos los integrantes de la cadena de producción, y sensibilización de cambio de mentalidad y percepción del consumo y la influencia social y económica de alimentos inocuos en la sociedad.

La presencia de antibióticos en la leche es de gran responsabilidad del propio ganadero, por un mal manejo del producto en finca, al no respetar los tiempos de retiro de los medicamentos, al ordeñar las vacas que han presentado aborto o con períodos secos muy cortos, al utilizar medicamentos no aprobados, con carencia de registro sanitario, sobredosificación del medicamento, y sobre todo porque existe un práctica común de aplicar medicamentos sin recomendación del Médico Veterinario, administración por vías no recomendadas por los laboratorios fabricantes, mezcla con leches contaminadas al descartar únicamente la leche del cuarto mamario tratado; por lo que al tratarse de un producto básico en la canasta familiar, en nuestro país, y al representar la principal fuente de ingresos de miles de ganaderos ecuatorianos, es necesario implementar medidas de educación intensivas a los ganaderos y estrictos programas de vigilancia y control para contener este problema de salud pública, y solventar la incursión hacia mejores posibilidades de comercialización con mercados que manejan estándares internacionales más exigentes con alta demanda y mayor oportunidad de desarrollo para nuestra nación.

CONCLUSIONES.

El desarrollo de la presente investigación permite establecer las siguientes conclusiones:

1. Existe ausencia de aflatoxina M1 en las muestras de leche cruda obtenidas en las 22 fincas de mayor producción del cantón Biblián, durante los meses de abril-agosto, según los resultados obtenidos con el método inmunoenzimático de la prueba SNAP AFLATOXINAS M1 que cumple con la sensibilidad del límite permitido por la FDA y por la regulación ecuatoriana.

2. Existe contaminación de trazas de antibióticos en el 45 % de fincas objeto del presente estudio. Se han detectado 17 muestras de leche con trazas de antibióticos diagnosticadas con el método de inmunoensayo enzimático de las pruebas Trisensor y Triaminosensor, las cuales cumplen con los límites de sensibilidad de residuos de la UE, del CODEX y la regulación ecuatoriana.

4. Los antibióticos con mayor incidencia son los betalactámicos, detectados en un 65% de muestras positivas, esto se debe probablemente por su utilización frecuente en el tratamiento de la enfermedad mastitis, causada por infecciones bacterianas originadas principalmente por la falta de buenas condiciones de higiene antes, durante y después del ordeño. Se ha detectado también un 35 % de residuos de antibióticos amino glucósidos como gentamicina y neomicina. Y un 0% de residuos de antibióticos tetraciclinas, sulfas y estreptomicinas.

5. Al realizar el análisis por zona, se concluye que en la zona 2 existe mayor cantidad de positivos a trazas de antibióticos, probablemente porque en esta zona el asesoramiento técnico de planta es limitado y predomina la automedicación.

RECOMENDACIONES.

Es muy importante socializar la importancia de producir y consumir leche de calidad en nuestra sociedad. Por cuanto es tanto responsabilidad del productor, como del ciudadano consumidor, la empresa privada, y la gestión pública realizar una campaña masiva que concientice a toda la cadena de producción lechera los funestos riesgos para la salud de producir, comercializar y consumir leche adulterada con cualquier agente físico, químico y/o microbiológico.

Para minimizar el riesgo de obtener leche contaminada con aflatoxina M1 y afectar la salud irreversiblemente de miles de personas se recomienda:

- Implementar buenas prácticas agrícolas en los cultivos de producción de grano utilizado en alimentos de ganado
- Seleccionar con cuidado los granos con presencia de hongos, identificarlos, separarlos y desinfectarlos
- Garantizar que el sistema de almacenamiento cuente con condiciones de temperatura y humedad controlados.
- Desarrollar y utilizar variedades resistentes a la contaminación del hongo de origen.
- Alimentar al ganado lechero únicamente con productos concentrados de origen garantizado, con registro sanitario.
- Evitar la informalidad en la compra de mezclas de granos de origen desconocido
- Ejecutar un estricto sistema de vigilancia y control de la comercialización de alimento para ganado.
- Implementar, por parte de los organismos oficiales de control, un sistema de monitoreo en todo el País, que detecte residuos de aflatoxina en granos, en balanceados y en leche cruda para garantizar y salvaguardar la salud de los ecuatorianos como un derecho a una alimentación segura y a un buen vivir.

En cuanto a la presencia de residuos de antibióticos en la leche cruda recomiendo:

- Evitar el uso excesivo de fármacos veterinarios, mediante la aplicación de buenas prácticas veterinarias, preventivas que eviten la presencia de infecciones bacterianas que en lo principal ocasionan enfermedades como la Mastitis bovina que influye perjudicialmente al ganado en su estado de producción láctea.
- Utilizar antibióticos con prescripción del médico veterinario
- Dar estricto cumplimiento a las indicaciones del prescrito del producto
- Mantener un adecuado sistema de comunicación en las fincas, que permitan la separación de/los animales que han recibido tratamientos.

- Separar y descartar completamente la leche de los animales que han recibido tratamientos farmacéuticos durante los días necesarios en el tiempo de retiro.
- El sector oficial debe realizar un estricto control de la venta de antibióticos bajo prescripción médica.
- Socializar a nivel de consumidores las consecuencias a la salud pública que ocasionan este tipo de contaminación en la leche.
- Ejecutar estrictos sistemas de vigilancia y control de la comercialización de la leche cruda y procesada para consumo humano bajo los estándares indicados en la normativa específica para cada producto.
- Implementar sistemas de gestión de inocuidad en la producción primaria, con buenas prácticas ganadera, buenas prácticas de ordeño y de almacenamiento del producto
- Actualizar la normativa legal de inocuidad de alimentos de nuestro país, con estrictos parámetros de calidad referenciales que motiven a todos los involucrados en la cadena láctea, a producir y consumir productos sanos.
- Intervención de los organismos oficiales de control en todo el país,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Aranguren, E., Arguelles, M., (2009). **DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1 EN QUESOS FRESCOS COMERCIALIZADOS EN EL MUNICIPIO DE YOPAL, CASANARE, MEDIANTE LA TECNICA DE ELISA.** Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 1-26.
2. Armijo, J., & Calderón, J. (2009). **ESQUEMA DE ACCIONES PARA EVITAR, CONTROLAR Y DESINFECTAR PRODUCTOS DE HONGOS Y AFLATOXINAS,** *Rev. Per. Quím. Ing. Quím. Vol. 12 N.º 2, Págs. 15-24*
3. Astoviza, M. B., & Socarrás, M. M. (2005). **MICOTOXINAS Y CÁNCER.** *Rev Cub Invest Biomed, 1, 54-9.*
4. Barłowska, J., et al. **"NUTRITIONAL VALUE AND TECHNOLOGICAL SUITABILITY OF MILK FROM VARIOUS ANIMAL SPECIES USED FOR DAIRY PRODUCTION."** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10.6 (2011): 291-302.
5. Caballero, A. (2008). **TEMAS DE HIGIENE DE LOS ALIMENTOS.** *Editorial Ciencias Médicas (La Habana), 1-382.*
6. Cepeda, A., Carneán, A., Herrera, A., Martínez, M., Paseiro, P., Biesa, P., (2011). **INFORME DEL COMITÉ CIENTÍFICO DE LA AGENCIA ESPAÑOLA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICION (AESAN),** *Rev. Del Comité Científico Nro. 14, 27-24.*
7. Comisión del Codex Alimentarius en su 22º período de sesiones de (1997). **CÓDIGO DE PRÁCTICAS PARA REDUCIR LA AFLATOXINA B1 PRESENTE EN LAS MATERIAS PRIMAS Y LOS PIENSOS SUPLEMENTARIOS PARA ANIMALES PRODUCTORES DE LECHE, CAC/RCP 45**
8. Comisión del Codex Alimentarius en su 35º sesión (2012). **LIMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS PARA MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN LOS ALIMENTOS.,** CAC/LMR 2-2012, 1-40
9. Comisión Europea (2009). **SUSTANCIAS FARMACOLÓGICAS ACTIVAS Y SU CLASIFICACION POR LO QUE SE REFIERE A LOS LÍMITES MÁXIMOS DE**

RESIDUOS EN LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS DE ORIGEN ANIMAL.

Reglamento (UE) Nro. 37 2010 de la Comisión de 22 de diciembre del 2009.1-72

10. Cué Brugueras, M., & Morejón García, M. (1998). **ANTIBACTERIANOS DE ACCIÓN SISTÉMICA:** Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14(4), 347-361.
11. Comisión de la Comunidad Andina, (2001). **NORMAS PARA EL REGISTRO, CONTROL, COMERCIALIZACIÓN Y USO DE PRODUCTOS VETERINARIOS.** Acuerdo de Cartagena 483, 1 - 29
12. Díaz, C., (2008). **DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS Y SULFONAMIDAS EN SEIS MARCAS COMERCIALES DE LECHE DE MAYOR CONSUMO EN LA CIUDAD DE RIOBAMBA.** Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 1-80.
13. Díaz, G. J. (1995). **REGULACIÓN DE NIVELES MÁXIMOS TOLERABLES DE MICOTOXINAS EN MATERIAS PRIMAS Y ALIMENTOS TERMINADOS.** *Veterinaria al Día*, 1(3), 122-27.
14. Gancho-Grande. B, García-Falcón, M. S., & Simal-Gándara, J. (2000). **EL USO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL:** Perspectiva actual. *Cien. Technol. Alim*, 3, 39-47.
15. Gimeno, A., & Martins, M. L. (2003). **MICOTOXINAS Y MICOTOXICOSIS EN ANIMALES Y HUMANOS.** *Talleres gráficos del SRL, Buenos Aires (Argentina)*, 1-160.
16. Guerrero D, Motta R, Gamarra G, Benavides E, Roque M, Salazar M (2009). **DETECCION DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS Y TETRACICLINAS EN LECHE CRUDA COMERCIALIZADA EN EL CALLAO.** *Ciencia e Investigación*; 12(2): 79-82
17. Gutiérrez, R., Vega, S., Pérez, J. J., Ruiz, J. L., Yamazaki, A., Rivera, J. G., ... & Escobar, A. (2013). **EVALUACIÓN DE AFLATOXINA M1 EN LECHE ORGÁNICA PRODUCIDA EN TECPATÁN, CHIAPAS, MÉXICO.** *Revista de Salud Animal*, 35(1), 33-37.

18. Instituto Ecuatoriano de Normalización (2012). **LECHE CRUDA REQUISITOS: NTE INEN 9: 2012** , Quinta revisión
19. López, V., María J., (2012), **DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS B1 B2 G1 G2 PRESENTES EN HARINA DE MAIZ DEL SECTOR TUMBACO MEDIANTE EL USO DE COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD (IAC) Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)**. *Universidad Politécnica del Ejército*. 1-12
20. Magariños, H. (2000). **PRODUCCIÓN HIGIÉNICA DE LA LECHE CRUDA**. *Editorial Producción y Servicios Incorporados, Mateo Flores, Guatemala* 1-104.
21. Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., Tordecilla, G., (2009). **DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE: UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA**, *Revista de Salud Pública* 11 (4): 579 – 590.
22. Martínez, J. D. G. (2002). **MICOTOXINAS EN RUMIANTES, UN PROBLEMA PASADO O PRESENTE. CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MEDICINA INTERNA VETERINARIA**. *León: Universidad de León, 2002; pp. 66-81*.
23. Parra-Trujillo,E., Pelaez-Suarez,L.,Londoño-Arango,J., Perez-Almario,N.,Rengifo-Benitez,g. (2003). **LOS RESIDUOS DE MEDICAMENTOS EN LA LECHE PROBLEMÁTICA Y ESTRATEGIAS PARA SU CONTROL: Manual Técnico** Código 2-1-10-06-02-ISBN
24. Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., & Pavlovic, M. (1999). **EFFECTOS TÓXICOS DE LAS MICOTOXINAS EN EL SER HUMANO**. *Bulletin of the world health organization*, 77(9), 754-766.
25. Pérez, J., Gutiérrez, R., Vega, S., Díaz, G., Urbán, G., Coronado, M., & Escobar, A. (2008). **OCURRENCIA DE AFLATOXINA M1 EN LECHE CRUDA, ULTRAPASTEURIZADA Y ORGÁNICA PRODUCIDAS Y COMERCIALIZADAS EN EL ALTIPLANO MEXICANO**. *Revista de Salud Animal*, 30(2), 103-109.s
26. Prado,G., Carabias, R., Rodríguez, E., Herrero, E., (2002). **PRESENCIA DE RESIDUOS Y CONTAMINACIÓN EN LECHE HUMANA**. *Rev. Esp. Salud Pública*; 76: 133-147

27. Rendon, N., (2007). **DETERMINACION DE LA PRESENCIA DEL GEN CODIFICADOR DE LA AFLATOXINA PRODUCIDA POR ASPERGILLUS FLAVUS EN LA CASTAÑA (BERTHOLLETIA EXCELSA) , MEDIANTE LA TECNICA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).** *Universidad Mayor de San Andrés* 1-103
28. Reglamento Técnico MERCOSUR, (2002) **LÍMITES MÁXIMOS DE AFLATOXINAS ADMISIBLES EN LECHE, MANÍ Y MAIZ,** Mercosur GMC/RES/N°25/02 – 1-6
29. Taberta, M., Páez, R., Resconi, V., Fabro, M., Speranza, J., Walter, E., Castañeda, R., De María, M., Scarafía, D., (2005). **PROCEDIMIENTO DE MUESTREO DE LECHE EN EL TAMBO Y DE MEDICIÓN DE VOLUMEN Y TEMPERATURA,** *Ediciones del INTI, Argentina* 1-36.
30. Urrego, N., José R., and DIAZ, Gonzalo J. (2006). **AFLATOXINAS: MECANISMOS DE TOXICIDAD EN LA ETIOLOGÍA DE CÁNCER HEPÁTICO CELULAR.** *Rev.fac.med.unal* [online]., vol.54, n.2, pp. 108-116. ISSN 0120-0011.
31. Vásquez, M. (2006) **EVALUACIÓN DE AFLATOXINAS EN SUPLEMENTOS PARA VACAS LECHERAS EN LA SABANA DE BOGOTÁ, Y SU RELACIÓN CON AFLATOXINA M1 EN LECHE,** *Universidad de la Salle, Bogotá* 1-90
32. Zambrano, J., Martinez, N., (2009). **EVALUACION DE LA REDUCCIÓN DE AFLATOXINA M1 CON DOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS RESPECTO A LECHE CRUDA EN HATOS DE LA SABANA DE BOGOTA.** *Universidad de la Salle (Santa Fe de Bogota),* 1-62
33. Zuber, M., Renfro, B., Lillehoj, E., (1986) . **AFLATOXIN IN MAIZE. AFLATOXIN IN ECUADOR. S. ESPIN DE RIVERA.** Nutrition Department. National Agricultural Research Institute. Quito, Ecuador *CIMIT, UNDP and UASAIID (Mexico)* 1-388 (334)

ANEXOS.

Anexo 1. Cuadro de Identificación de las 22 fincas de estudio.

IDENTIFICACION DE LAS FINCAS				
N° DE FINCA	ZONA	NOMBRE DE LA FINCA	NOMBRE DEL PROPIETARIO	SITIO
1	I	S/N	MANUEL PALAGUACHI GUAMAN	DURAN BURGAY
2	I	RANCHO VERDE	RENE VALDIVIESO MUÑOZ	BURGAY
3	II	S/N	MANUEL BENJAMIN LOPES OJEDA	BUESTE
4	III	ALBERTO MONTERO	BOLIVAR MONTERO ZEA	PONDEROSA
5	II	S/N	MELCHOR IDROVO MUÑOZ	MOSQUERA
6	III	MANGAN	CARLOS ALBERTO RIVERA CALLE	MANGAN
7	II	S/N	SEGUNDO PEDRO ESPINOZA	AGUARONGO
8	I	BURGAY	ELIDA MENDES OCHOA	BURGAY LA CARMELA
9	II	BUESTE	PATRICIO MUÑOZ GONZALES	EL BUESTE
10	I	SAN ANDRES	MIGUEL OSWALDO SIGUENCIA URGILES	CARMELA
11	III	S/N	GIL RIVERA CALLE	
12	I	CONSEJO PROVINCIAL DEL CAÑAR	CONSEJO PROVINCIAL DEL CAÑAR	BURGAY
13	II	S/N	CIRILO CALLE LLIGUICOTA	MOSQUERA
14	I	SAN GALO	JUAN PABLO JARAMILLO	BURGAY
15	III	TEJAHUASI	WALTER LEONEL ALVARADO ARGUDO	JABASPAMBA
16	I	RANCHO SANTIAGO	ANGELITA MURUDUMBAY CHUQUI	CARMELA
17	II	S/N	JUAN PATRICIO MUÑOZ MENDEZ	MOSQUERA
18	I	SAN ALFONSO	FELIPE JAVIER ANDRADE ULLAURI	JERUSALEN
19	I	RIO DULCE	PABLO CRÉSPO VINTIMILLA	BURGAY
20	III	S/N	CLODOBEO ISAAC CALLE PORTILLA	PONDEROSA
21	I	COMERCIAL LEPAX	COMERCIAL LEPAX	BURGAY
22	I	AGROGANADERA LA ESMERALDA	HENRY ELJURY	BURGAY

Anexo 2. Encuesta a ganaderos.

**AGENCIA ECUATORINA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO
AGROCALIDAD - CAÑAR**
VIGILANCIA Y MONITOREO DE LA CALIDAD DE LA LECHE CRUDA EN FINCAS DE ALTA PRODUCCION LECHERA
ESTUDIO DE TESIS / DETERMINACION DE PRESENCIA O AUSENCIA DE CONTAMINANTES EN LA LECHE CRUDA

FECHA			
NOMBRE DE LA FINCA			
NOMBRE DEL PROPIETARIO			
UBICACION	NORTE	TELEFONO	
	ESTE	DIRECCION	
DIRECCION ELECTRONICA:		SITIO	PARROQUIA

NO. DE ANIMALES		TIPO DE ALIMENTACION		TIPO DE ORDEÑO	
VACAS EN PRODUCCION		PASTO		MANUAL	
VACAS SECAS		BALANCEADO		MECANICO	
VACONAS		MEZCLA		NO. DE LITROS PROMEDIO AL DIA	
TERNEROS		DETALLE		ORDEÑO MAÑANA	
TERNERAS		NOMBRE DEL PASTO		ORDEÑO TARDE	
TOROS		NOMBRE DEL BALANCEADO		LUGAR A DONDE ENTREGA LA LECHE	
TOTAL		TIPO DE MEZCLA			

OBSERVACIONES: _____

LUGAR DE ALMACENAMIENTO					
TIENE BODEGA DE ALMACENAMIENTO DE ALIMENTO		INFORMACION DE LOS SACOS DISPONIBLES EN LA BODEGA			
SI		NO. DE SACOS DISPONIBLES EL DIA DE LA VISITA	BALANCEADO qq	MEZCLA qq	OTRO qq
NO		FRECUENCIA DE COMPRA DE LOS SACOS DE	BALANCEADO	MEZCLA	OTRO
CONDICIONES DE LA BODEGA		TODOS LOS DIAS			
AMBIENTE CERRADO		CADA SEMANA			
AMBIENTE ABIERTO		QUINCENAL			
HUMEDO		MENSUAL			
NORMAL / SECO		OTRO			
CONTROL DE TEMPERATURA		LUGAR DE COMPRA	BALANCEADO	MEZCLA	OTRO
SI		PARROQUIA			
NO		CANTON			
VENTILACION		PROVINCIA			
SI		OTRO			
NO		OTRO			
CANTIDAD DE RACION DIARIA POR ANIMAL kg.					

OBSERVACIONES: _____

BODEGA DE FARMACOS					
FARMACOS MAS UTILIZADOS EN LA FINCA/DISPONIBLES O NO EL DIA DE LA VISITA					
TIPO DE FARMACO	NOMBRE COMERCIAL	PRINCIPIO ACTIVO	PRESENTACION	FECHA DE CADUCIDAD	TIEMPO DE RETIRO
ANTIBIOTICOS					
ANTIBIOTICOS					
ANTIBIOTICOS					
TIPO DE FARMACO	NOMBRE COMERCIAL	PRINCIPIO ACTIVO	PRESENTACION	FECHA DE CADUCIDAD	TIEMPO DE RETIRO
ANTIPARASITARIO					
ANTIPARASITARIO					
ANTIPARASITARIO					

TIPO DE FARMACO	NOMBRE COMERCIAL	PRINCIPIO ACTIVO	PRESENTACION	FECHA DE CADUCIDAD	TIEMPO DE RETIRO
DESINFECTANTE					
DESINFECTANTE					
TIPO DE FARMACO	NOMBRE COMERCIAL	PRINCIPIO ACTIVO	PRESENTACION	FECHA DE CADUCIDAD	TIEMPO DE RETIRO
DETERGENTE					
DETERGENTE					

REGISTRO DE SANIDAD ANIMAL

PLAN DE VACUNACION					
AFTOSA		BRUCELOSIS		CARBUNCO	
SI		SI		SI/CUAL	
NO		NO		NO	

REGISTRO DE APLICACION DE FARMACOS

FECHA DE LA ULTIMA APLICACION		NOMBRE COMERCIAL	
TIPO DE FARMACO		NOMBRE GENERICO	
MOTIVO DE APLICACION		RESPONSABLE DE LA APLICACION	
NO. DE ANIMALES TRATADOS		NO. DE ARETES DE ANIMALES TRATADOS	

OBSERVACIONES: _____

CALENDARIO DE DESPARASITACION

FRECUENCIA DE DESPARASITACION	TRIMESTRAL	SEMESTRAL	ANNUAL	OTRO
FECHA PROGRAMADA PARA LA PROXIMA APLICACION				

LUGAR DONDE COMPRA LOS FARMACOS _____

OBSERVACIONES: _____

LUGAR DE ORDENO

TRABAJADOR /ES	DISPONIBILIDAD DE AGUA	HORA DEL ORDENO
UTILIZA OBEROL	FRIA	MAÑANA
BOTAS	CALIENTE	TARDE
GORRA		
GUANTES		

PROCESO DE ORDEÑO POR VACA	LAVADO DE LA UBRE	SECADO	ORDEÑO	SELLADO	OTRO
ALMACENAMIENTO DE LA LECHE	TANQUE FRIO	CANTARELLA DE ACERO INOXIDABLE	CANTARELLA DE PLASTICO	OTRO SISTEMA	

TIEMPO QUE TRANSCURRE ENTRE ORDEÑO Y ENVIO DE LA LECHE _____

NOMBRE DEL TRANSPORTISTA/S _____

LUGAR/ES DE DESTINO _____

DESINFECCION DE LA SALA DE ORDEÑO	COMO Y CON QUE PRODUCTO
DIARIO	
SEMANAL	
QUINCENAL	
OTRO	

OBSERVACIONES: _____

NOMBRE Y FIRMA DEL ENCUESTADOR

NOMBRE Y FIRMA DEL ENCUESTADO

Anexo 3. Fotografías de la toma y análisis de muestras.



Encuesta



Toma de muestras



Medición de parámetros básicos



Recolección de muestras en tanques



Recolección de muestras en bidones



Recipientes de acero inoxidable



Transporte de las muestras



Refrigeración de las muestras



Revisión de la identificación



Análisis de las muestras

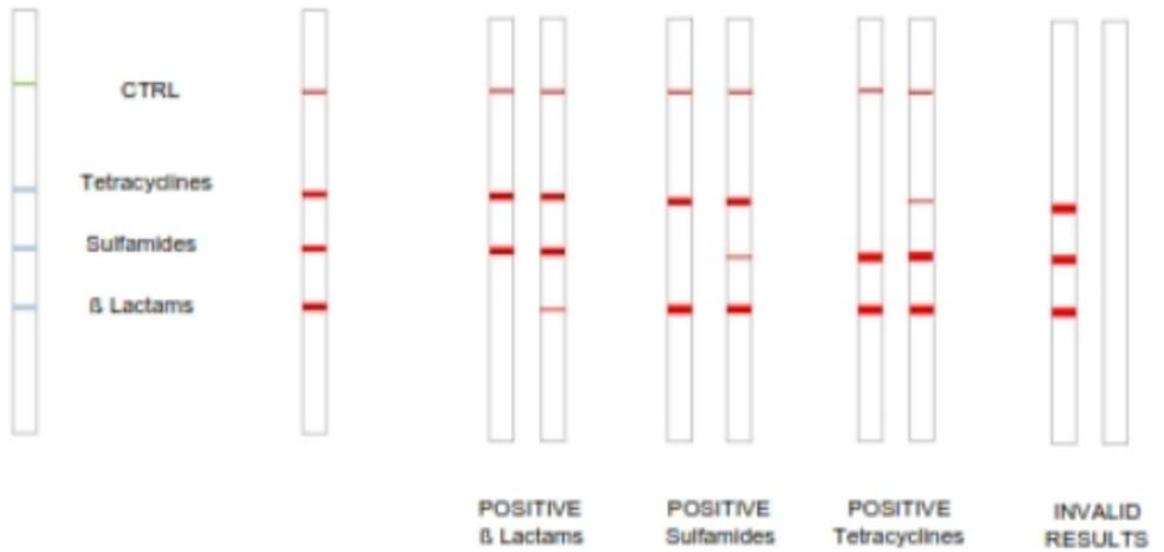


Resultados de antibióticos

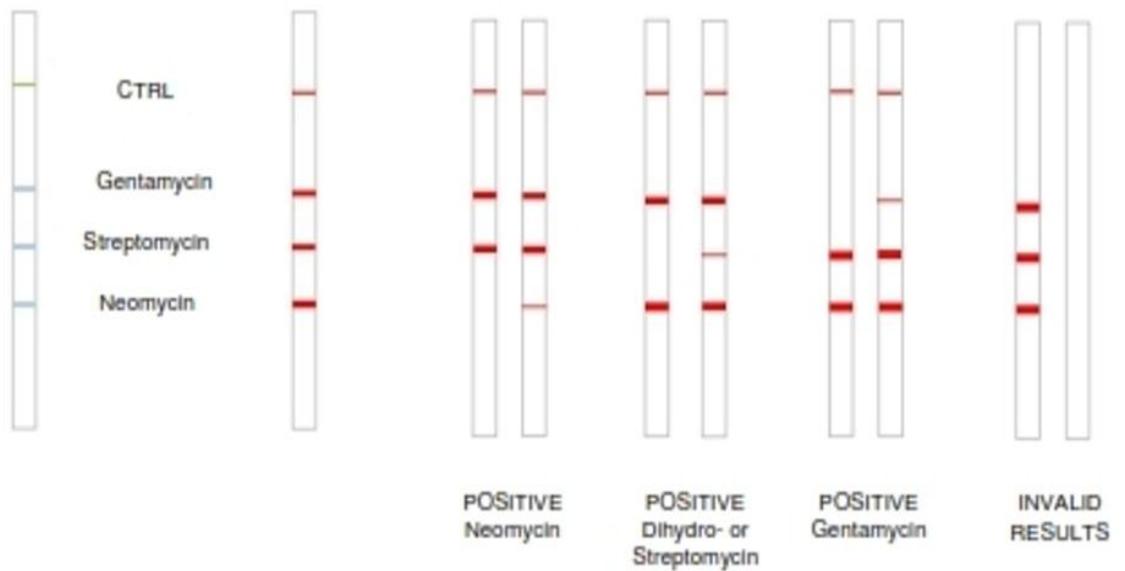


Resultados de aflatoxinas

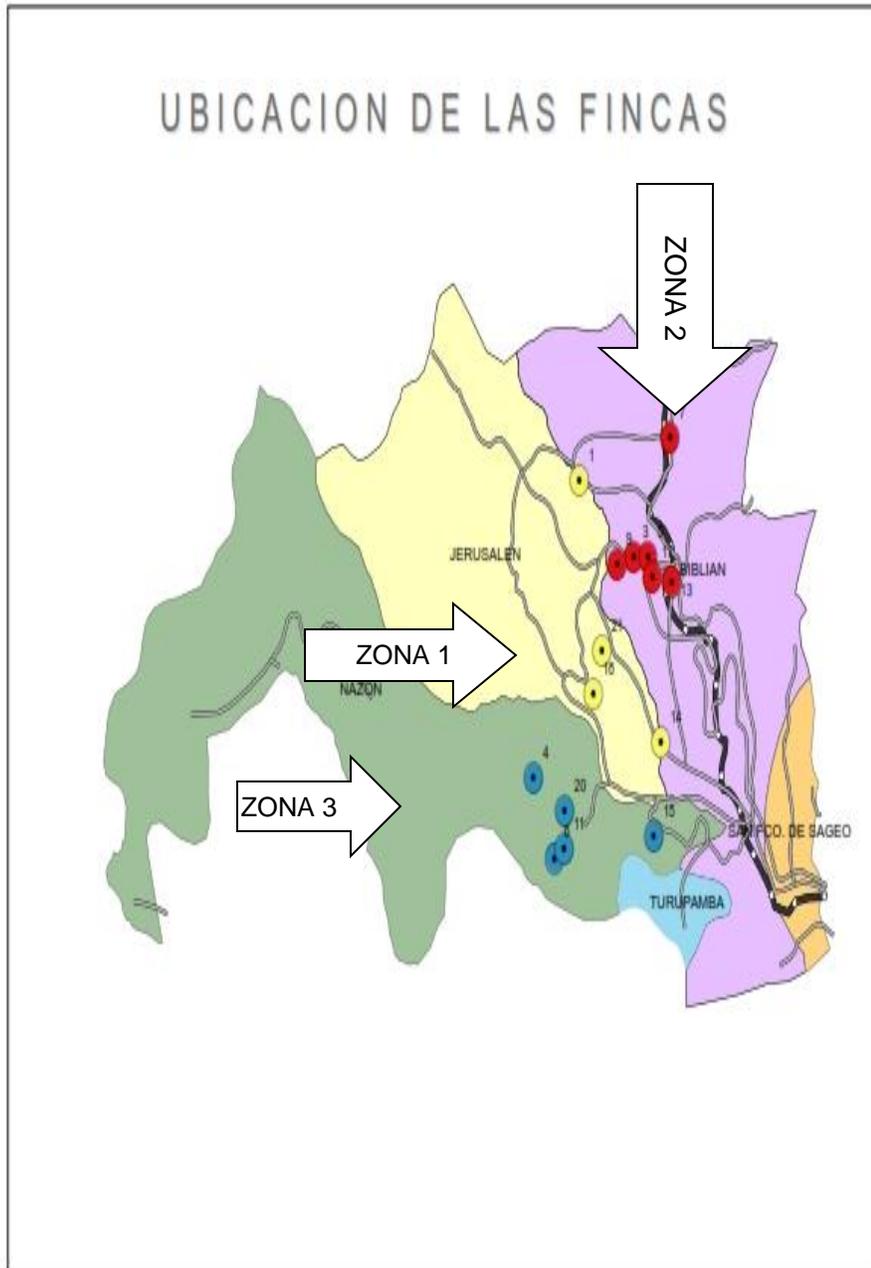
Anexo 4. Interpretación visual de los resultados del Kit Trisensor.



Anexo 5. Interpretación visual de los resultados del Kit Triaminosensor.



Anexo 6. Distribución de las fincas en el área de estudio.



TEMA....	
PLANO:	UBICACIÓN DE FINCAS
CONTEN:	UBICACIÓN DE FINAS
REALIZADO:	FECHA: A2004..._2004
	N° PLANO: 1