

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Escuela de Bromatología y Nutrición Humana



TESIS

**“DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y
CARGA MICROBIANA DE LA LECHE CRUDA, QUE SE
EXPENDE EN LA CIUDAD DE IQUITOS, 2013”**

Trabajo Final de Carrera para optar el Título Profesional de Licenciado en
Bromatología y Nutrición Humana

Presentado por:

Br. JOSÉ MANUEL CASTILLO RENGIFO

Asesora: Blga. Jessy Patricia Vásquez chumbe. Mgr.

IQUITOS - PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Tesis aprobada en sustentación pública el día viernes 18 de Julio del 2014, por el jurado designado por la Dirección de Escuela de Formación Profesional de Bromatología y Nutrición Humana, para optar el título de:

LICENCIADO EN BROMATOLOGIA Y NUTRICIÓN HUMANA

Presidente

Miembro

Miembro

Miembro Suplente

Asesora

Decano

**“DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y CARGA
MICROBIANA DE LA LECHE CRUDA, QUE SE EXPENDE EN LA CIUDAD
DE QUITOS, 2013”**

Br. José Manuel Castillo Rengifo

RESUMEN:

Esta investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de penicilina G, tetraciclina y la carga microbiológica de la leche cruda de 4 expendedores y 4 ganaderías de la ciudad de Iquitos en el 2013. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de microbiología de alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Se analizaron un total de 24 muestras de leche, obtenidas en tres muestreos diferentes. El método de análisis usado para la determinación de antibióticos fue mediante el kit SNAPduo™ beta-tetra ST Test, de laboratorios IDEXX de los Estados Unidos, el cual cumple con los límites de sensibilidad de residuos de la FDA. El análisis de la carga microbiana abarcó microorganismos indicadores de alteración (bacterias aerobias mesófilas), por la técnica de recuento estándar en placa, e indicadores de higiene (coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*) por la técnica del número más probable. Estos recuentos se compararon con lo establecido en la norma microbiológica vigente para la leche cruda, para determinar si son aptas o no aptas.

Los resultados fueron que se encontraron antibióticos en 5 muestras de leche, que equivalen al 20,8%. Respecto a la carga microbiana, el 75% (18 muestras) no son aptas para el consumo humano de acuerdo a la norma sanitaria. Del total de muestras no aptas (75%) el 58,3% corresponde a aerobios mesófilos y el 75% a coliformes totales. Además se encontró coliformes fecales en el 100% de muestras y presencia de *Escherichia coli* en el 66,7%.

Palabras claves: Leche cruda, residuos de antibióticos, carga microbiana.

**DETERMINATION OF RESIDUES OF ANTIBIOTICS AND MICROBIAL
LOAD OF RAW MILK THAT IS SOLD IN THE CITY OF IQUITOS, 2013**

Br. José Manuel Castillo Rengifo.

ABSTRACT:

This research was to determine the presence of penicillin G, tetracycline and microbiological load of raw milk, from four outlets and herds of Iquitos, in 2013.

Samples were processed in the food microbiology laboratory of the Faculty of food Industry of the National University of the Peruvian Amazon. A total of 24 milk samples obtained from three different samples were analyzed. The method of analysis used for the determination of antibiotics was using the beta tetra kit SNAP duo St-Test, from IDEXX laboratories of the United States, which the limits of sensitivity of residues FDA. The analysis of the microbial alteration spanned indicator microorganism (mesophilic aerobic bacteria) by the technique of standard plate count, and hygiene indicators (total coliforms, fecal coliforms and *Escherichia coli*) by the most probable number technique. These counts were compared with the provisions of the current microbiological standards for raw milk, to determine if they are suitable or unsuitable for human consumption.

The results were that antibiotics found in 5 of the milk samples, that's equivalent to 20,8%. About analysis of the microbiological load the 75% (18 samples) are unsuitable for human consumption according to sanitary standards. Of total unsuitable samples (75%), the 58, 3% goes to mesophilic aerobic and 75% to total

coliformes. Also fecal coliforms was found in 100% of the sample also the presence of *Escherichia coli* in 66,7%.

Key words: Raw milk, residues of antibiotics, microbial load.

*D*edicatoria

A Dios

Por lo maravilloso de su creación, su infinito amor, y por haberme permitido seguir aún con los que quiero, y ver cumplir junto a ellos mis metas. “El Señor es mi pastor nada me faltara, en verdes pastos me hace descansar, junto a aguas de reposo me conduce... Aunque pase por el valle de sombra de muerte, no temeré mal alguno, porque Tú estás conmigo, Tu vara y Tu cayado me infunden aliento”. SALMO 23.

A mis padres

Carmen Rengifo.

Por darme la vida, por ser la mejor madre, por ser mi amiga y siempre acompañarme en mis pasos y decisiones. Nunca olvidare que siempre estuviste en el momento que más te necesitaba.

Alfredo Castillo.

Por ser mi compañero, por motivar a que mis sueños se hagan realidad, y porque quiero que siempre se sientan orgullosos de mí. A los dos les agradezco.

A mi familia y amigos

A mi sobrino Jose Mathias y mi hermana Flor, porque siempre confían en mí, me respaldan y brindan su apoyo.

José Manuel Castillo Rengifo

Agradecimiento

**A LA UNIVERSIDAD NACIONAL
DE LA AMAZONIA PERUANA** *Por la formación profesional brindada
durante los años que me acogió.*

**A NUESTROS DOCENTES
DIRECTORES** *Por guiar con esmero el rumbo de
nuestra casa de estudio y de nuestra
escuela profesional haciéndola cada vez
más grande e importante.*

**A LA FACULTAD DE
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS** *Por brindarme la infraestructura y
equipos necesarios para la realización de
las pruebas de laboratorio, y a los amigos
profesionales que colaboraron conmigo
Tany Lorena López y Luis Ayala.*

A MI ASESORA: *Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe.
Mgr. Por su amabilidad de brindarme
asesoramiento, su amplio conocimiento y
experiencia para realizar esta
investigación.*

José Manuel Castillo Rengifo

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
DEDICATORIA	7
AGRADECIMIENTO	8
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	14
CAPITULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
CAPITULO III. REVISIÓN DE LITERATURA	19
3.1. ANTECEDENTES	19
3.2. BASE TEÓRICA	21
3.2.1. GENERALIDADES DE LA LECHE	21
3.2.1.1. Leche cruda entera	21
3.2.1.2. Componentes de la leche	22
3.2.1.3. Calidad de la leche	24
3.2.2. MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE	25
3.2.2.1. Bacterias gram positivas	25
3.2.2.1.1. Bacterias lácticas	26
3.2.2.1.2. Micrococcus	26
3.2.2.1.3. Estafilococcus	27
3.2.2.1.4. Bacterias esporuladas	27
3.2.2.1.5. Diversas	27

3.2.2.2. Bacterias gram negativas	28
3.2.2.2.1. Enterobacterias	28
3.2.2.2.2. Acromobacterias	28
3.2.2.2.3. Diversas	29
3.2.2.2.4. Micobacterias	29
3.2.2.3. Levaduras	30
3.2.2.4. Hongos	30
3.2.2.5. Microorganismos y la leche	30
3.2.2.6. Métodos de estimación de la carga microbiana total de la leche	32
3.2.2.6.1. Determinación de aerobios mesófilos	32
3.2.2.6.2. Determinación de bacterias coliformes	33
3.2.3. ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA PECUARIA	34
3.2.3.1. Los antibióticos	35
3.2.3.2. Clasificación	35
3.2.3.3. Antibióticos y usos en el ganado bovino	36
3.2.3.4. Farmacocinética del antibiótico	37
3.2.3.5. Factores que afectan la excreción mamaria de los antibióticos	38
3.2.3.6. Mecanismos de acción	40
3.2.4. RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE	42
3.2.4.1. Normativa para los residuos de antibióticos en leche	42
3.2.4.2. Tiempo o período de retiro o supresión	42
3.2.4.3. Riesgos de los residuos de antibióticos para la salud	43
3.2.4.4. Importancia en la industria láctea	45

3.2.4.5. Termoestabilidad de los antibióticos en leche	46
3.2.4.6. Métodos de detección de residuos de antibióticos en leche	47
3.2.4.7. Prueba Snapduo Beta-Tetra ST Test	48
CAPITULO IV. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	50
CAPITULO V. HIPÓTESIS	51
CAPITULO VI. MÉTODO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	52
6.1. Tipo y diseño de la investigación	52
6.2. Selección del área de estudio	53
6.3. Población y muestra	54
6.4. Criterios de inclusión y exclusión	54
6.5. Definiciones operacionales de las variables	55
6.6. Procedimiento para la recolección de la información	57
CAPITULO VII. CONTROL DE CALIDAD Y BIOSEGURIDAD	70
CAPITULO VIII. ANÁLISIS DE DATOS RESULTADOS	70
CAPITULO IX. ASPECTOS ÉTICOS.	71
CAPITULO X. MATERIALES	72
CAPITULO XI. RESULTADOS	76
CAPITULO XII. DISCUSIONES	88
CAPITULO XIII. CONCLUSIONES	96
CAPITULO XIV. RECOMENDACIONES	98
CAPITULO XV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
CAPITULO XVI. ANEXOS	108
CAPITULO XVII. FOTOS	119

LISTA DE ANEXOS

ANEXO N° 01:	Encuesta realizada a productores pecuarios sobre manejo de ganado bovino y producción láctea.	109
ANEXO N°02:	Certificado de análisis de los kits Snapduo.	110
ANEXO N° 03:	Límites máximos de antibióticos en leche.	111
ANEXO N° 04:	Norma sanitaria de calidad e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano.	111
ANEXO N° 05:	Número de unidades de toma de muestra para la vigilancia sanitaria. (NTS N° 071 Minsa/Digesa -v.01)	112
ANEXO N° 06:	Tabla del número más probable.	112
ANEXO N° 07:	Tabla para diferenciación de coliformes.	113
ANEXO N° 08:	Valores de recuento estándar en placa transformados a logaritmo base 10.	114
ANEXO N° 09:	Esquema N° 01: Flujograma de la investigación.	115
ANEXO N° 10:	Diagramas de los recuentos microbiológicos.	116

LISTA DE FOTOS

FOTO N°01:	Agitador.	58
FOTO N°02:	Muestreador para leche.	58

FOTO N°03:	Transporte de muestras de leche hasta el laboratorio	59
FOTO N°04:	Material de vidrio esteril.	120
FOTO N°05:	Preparación de medios de cultivo.	120
FOTO N°06:	Preparación del inóculo.	121
FOTO N°07:	Homogenización.	121
FOTO N°08:	Inoculación de las placas.	121
FOTO N°09:	Inoculación: coliformes totales	122
FOTO N° 10:	Inoculación: coliformes fecales.	122
FOTO N° 11:	Lectura de resultados: aerobios mesófiloscoliformes.	123
FOTO N° 12:	Lectura de resultados: coliformes	123
FOTO N° 13:	Determinación de Escherichiacoli: aislamiento de cultivo.	124
FOTON°14:	Tubos de agar nutritivo con cultivos puros.	124
FOTO N°15:	Prueba del indol	124
FOTO N° 16:	Citrato sódico Prueba de VoguesProskauer.	124
FOTO N° 17:	Kit Snapduo.	125
FOTO N° 18:	Toma de muestra.	125
FOTO N° 19:	Realización de la prueba.	125
FOTO N° 20:	Ejecución.	125

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

De acuerdo con los organismos internacionales de referencia, la leche y sus derivados pertenecen al grupo de alimentos de mayor riesgo en salud pública, no solo por tratarse de un alimento básico y por lo tanto, de amplio consumo, sino por su susceptibilidad para transmitir enfermedades debido a la presencia de microorganismos y contaminantes como los antibióticos.^{1,2,3,4} Por esta susceptibilidad de causar problemas en la salud de los consumidores, se tiene dentro de los controles que debe cumplir la leche, el recuento microbiológico y la determinación de residuos de antibióticos, que debe realizarse por los organismos competentes para asegurar la inocuidad del alimento.

En la región Loreto la producción ganadera de la leche de bovino no es extensiva, está sub-desarrollada comparado con otras regiones del país, por lo general no se tienen instalaciones apropiadas para el ganado y la alimentación se basa principalmente de esquilmos agrícolas o pastoreo de rastrojos, teniendo como canales de comercialización la venta directa de leche cruda al consumidor y venta a acopiadores de leche para elaborar quesos artesanales.

Pero a pesar del limitado desarrollo de este sector pecuario, no se puede negar que el uso de antibióticos es una de las principales herramientas en el control y erradicación de numerosas enfermedades infecciosas de origen bacteriano, como la mastitis y los parasitismos que aquejan al ganado productor de leche; siendo los medicamentos de mayor uso para su control, los antibióticos de amplio

espectro, como los betalactámicos y tetraciclinas, por ser fáciles de adquirir, económicos y ampliamente conocidos por los ganaderos.

Los antibióticos betalactámicos, se usan generalmente en el tratamiento de la mastitis, procesos piógenos, carbón sintomático, edema maligno, hemoglobinuria bacilar, tétano, pielonefritis, leptospirosis, listeriosis, entre otras. En el caso de las tetraciclinas, se suelen utilizar en infecciones sistémicas como las respiratorias, entéricas, casos de metritis, mastitis, anaplasmosis, leptospirosis, poliartritis infecciosa, pierna negra y otras.^{5,6} Hay que agregar a estos que pueden también ser usados como promotores de crecimiento. Sin embargo el empleo de estos medicamentos requiere de evaluaciones y pruebas que demuestren la inexistencia de concentraciones de estos en leche, ya que aunque puedan estar presentes en cantidades relativamente bajas, éstas constituyen un potencial peligro si se consumen constantemente pudiendo llegar a provocar distintas alteraciones a la salud, tales como la sensibilización producida por una ingestión repetida de pequeñas dosis, procesos alérgicos en las personas, que en casos extremos llevarán a anafilaxia y provocar perturbaciones pasajeras en la flora intestinal, así mismo, reacciones de intoxicación frente a determinados antibióticos de gran toxicidad.^{7,8}

El otro control importante que debe cumplir la leche es la carga microbiológica presente en este alimento, que es muy variada por ser una fuente rica en nutrientes, que favorece el crecimiento y la multiplicación, donde recuentos elevados de microorganismos aerobios mesófilos en la leche cruda son

indicadores de alteración y su probable vida útil. Dentro de la familia coliformes se encuentran los coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*, indicadores de la higiene en el ordeño, transporte y/o manipulación una vez que esta fue obtenida. Si estos parámetros microbiológicos no son controlados ponen en riesgo la salud de los consumidores. Esto nos lleva a la necesidad de poner énfasis en el cumplimiento de la norma y evitar las posibles toxiinfecciones causada por cualquiera de los principales microorganismos de importancia en los alimentos.

Por lo anteriormente expuesto, el presente estudio tiene como objetivo el análisis de muestras representativas, primero para detectar o no la presencia de residuos antibióticos en leche cruda, teniendo como base el método cualitativo de un kit SNAP, y segundo la determinación cuantitativa de la carga microbiológica por medio del análisis microbiológico.

CAPÍTULO II: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las toxiinfecciones alimentarias y el fenómeno de resistencia bacteriana, pueden ser graves consecuencias obtenidas por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos y antibióticos, respectivamente. Por esto es de suma importancia evitar que productos alimenticios como la leche contengan residuos de estas sustancias químicas, y que los cuidados dentro de las explotaciones pecuarias sea la principal preocupación para aquellos que producen y comercializan este alimento.

Se puede describir de forma general, dos grandes problemas dentro del ámbito de estudio:

a) Deficiente manejo de la tecnología de producción:

Entre los problemas detectados en muchos países, incluido el Perú, es el uso indiscriminado de antibióticos y el irrespeto del periodo de retiro de las vacas tratadas con medicamentos, además de las malas prácticas de higiene en las explotaciones pecuarias. Las razones son variadas pero las principales serían: la falta de capacitación técnica sobre el manejo de los animales, la escasa tecnología y equipación con la que cuentan las explotaciones ganaderas en nuestra ciudad, lo que deriva en problemas de residualidad o contaminación, consecuencia de la proliferación bacteriana.

b) Debilidad de la institucionalidad local:

Según el Reglamento del Decreto Legislativo N° 1062. Ley de inocuidad de los alimentos (DS N° 034-2008 AG) la vigilancia sanitaria de los alimentos de

producción y procesamiento primario de origen agropecuario, así como la alimentación de animales destinados a la producción de alimentos para el consumo humano, la vigilancia de contaminantes físicos, químicos y biológicos, que puedan afectar a estos alimentos y piensos, además de la vigilancia de las aguas para riego agrícola, están a cargo del Servicio Nacional de Sanidad Agraria - SENASA.⁹

La vigilancia de los establecimientos de comercialización, elaboración y expendio de alimentos y bebidas en la vía pública, están a cargo de los gobiernos locales (municipalidades)⁹, pero el insuficiente control de estos organismos a nivel de producción primaria y expendio, deja al consumidor en riesgo de ver declinar su salud. En forma general se puede afirmar que por el momento no se está aplicando estos controles para asegurar que la leche producida en estas explotaciones pecuarias y comercializadas en la vía pública en la mayoría de los casos, se encuentren libres de contaminantes químicos como los antibióticos, y que la microbiota de la leche este dentro de los límites críticos para ser aceptable su comercialización.

Teniendo en consideración lo mencionado el problema de estudio queda definido mediante la siguiente interrogante: ¿La leche cruda que se expende en la ciudad de Iquitos, presentará residuos de antibióticos: penicilina G, tetraciclina y recuentos de microorganismos permitidos, para su comercialización?

CAPÍTULO III: REVISIÓN DE LITERATURA

3.1). ANTECEDENTES

❖ A nivel internacional:

Arias *et al.* (2000), investigaron la presencia de residuos de penicilina en muestras de leche pasteurizada de marcas comerciales y 155 muestras de leche cruda de las regiones lecheras de Costa Rica, para lo cual emplearon el método de difusión en agar, el cual utilizó discos de papel impregnados con cepas de *Bacillus subtilis*. Resultaron positivos el 88% de las muestras de leche comercial y el 64.5% de la leche cruda.¹⁰

Barrera, M. *et al.* (2013), determinaron residuos de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en muestras de leche cruda provenientes de cinco ganaderías de San Luis Talpa (El salvador) y leche pasteurizada provenientes de dos empresas procesadoras. Se analizaron 25 muestras por medio de un análisis microbiológico. El análisis de tetraciclinas mostró, que solamente tres estaban por debajo del valor establecido (100µg/L); mientras que las leches procesadas dieron entre 449 µg/L hasta 8649 µg/L. El análisis de betalactámicos dio que las 25 muestras de leche cruda superaron el valor establecido (4µg/L), y las muestras de leche pasteurizada tenían desde 546 µg/L hasta 1740 µg/L de antibiótico por litro de leche.¹¹

❖ **A nivel nacional:**

Llanos (2002), realizó una investigación para determinar antibióticos en leche fresca comercializada en la ciudad de Cajamarca, utilizando dos métodos cualitativos: el de difusión en agar con el cultivo de la cepa *Bacillus stearothermophilus* como microorganismo indicador, y la prueba de difusión estándar Delvotest. Donde de las 216 muestras analizadas, obtenidas de tiendas, mercados y algunos fundos, en un periodo de tres meses, resultó que el 20.83% dieron positivo a antibióticos, siendo 20.67% positivos procedentes de los mercados y 21.21% de las muestras de tiendas y fundos.¹²

Guerrero *et al.* (2009), realizaron una investigación para determinar antibióticos del grupo betalactámico y tetraciclinas, en la leche cruda comercializada en mercados de la región Callao, para lo cual se uso el método cualitativo Kit Snap, y se analizaron 40 muestras durante un período de tres meses. Los resultados dieron que el 40% de las muestras fueron positivas a residuos de betalactámicos, y no se logró detectar residuos al analizar tetraciclinas en la leche.¹³

Reyna (2009), investigó la presencia de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en muestras de leche cruda, leche UHT y leche esterilizada envasada del mercado del Callao, y utilizó el kit Snap de laboratorios IDEXX, obteniéndose el 41.66% de positivos en leche cruda a residuos de betalactámicos, en leche UHT no se obtuvieron resultados positivos, y el 66.66% positivo en leche esterilizada envasada. No se detectaron tetraciclinas en ninguna de las muestras.¹⁴

❖ **A nivel local:**

Aun no se han realizado estudios sobre la presencia de residuos de antibióticos en la leche cruda que se expende en la ciudad de Iquitos.

Traverso (1983), en su estudio de control bacteriológico de la leche cruda que se comercializaba en la ciudad de Iquitos, analizó un total de 100 muestras, de las cuales 25 fueron leche cruda directamente de las ganaderías, 25 de camiones de reparto y 50 de los bares donde se expendía leche hervida refrigerada. Los resultados dieron 19% de muestras no aptas en la enumeración de microorganismos aerobios viales por el método de vertido en placa, el 64% en el recuento de coliformes totales y 74% de muestras no aptas a coliformes fecales por la técnica del número mas probable.¹⁵

3.2) BASE TEÓRICA

3.2.1. GENERALIDADES DE LA LECHE CRUDA.

3.2.1.1. Leche cruda entera:

Es el producto íntegro no alterado ni adulterado del ordeño higiénico, regular y completo de vacas sanas y bien alimentadas, sin calostro y exento de color, olor, sabor y consistencia anormales y que no ha sido sometido a procesamiento o tratamiento alguno.¹⁶

3.2.1.2. Componentes y características de la leche cruda.

En la composición de la leche, encontramos proteínas, lactosa, grasas, vitaminas, minerales y enzimas, difiriendo entre sí por el tamaño molecular y por su solubilidad, tornando a la leche en un complicado sistema físico-químico, donde: las moléculas menores representadas por las sales, lactosa y vitaminas hidrosolubles se presentan en un estado de solución verdadera, y las moléculas mayores (lípidos, proteínas y enzimas), aparecen en estado coloidal.¹⁷

En la composición de la leche influyen los siguientes factores:

- Raza y edad de la vaca
- Estado de salud
- Etapa de lactancia
- Alimentación
- Método de ordeño
- Clima.

Cuadro N° 01
COMPOSICIÓN MEDIA REPRESENTATIVA DE LA LECHE DE VACA,
SEGÚN LA RAZA.¹⁸

Raza	Agua	Grasa	Proteínas	Lactosa	Cenizas	Sólidos totales
Jersey	85.47	5.05	3.78	5.00	0.70	14.53
Brown Swiss	86.87	3.85	3.48	5.08	0.72	13.13
Holstein	87.72	3.41	3.32	4.87	0.68	12.28

Fuente: Fennema O.R., 1982.

Cuadro N° 02
REQUISITOS FÍSICOS-QUÍMICOS DE LA LECHE DE VACA.¹⁶

Parámetro	Requisito
Materia grasa (g/100g).	Min. 3.2
Sólidos no graso (g/100g).	Min 8.2
Sólidos totales (g/100g).	Min. 11.4
Impurezas macroscópicas, expresadas en mg de impureza por 500 cm ³ de leche.	Max. 0.5 mg. (grado 2)
Acidez expresada en g de ácido láctico por 100 g de leche.	Min. 0.14% Max. 0.18%
Densidad a 20° C(g/cm ³).	Min. 1.0286 Max. 1.0340
Índice de refracción del suero, 20 °C	Min. 1.34179
Ceniza total (g/100g).	Máx. 0.7
Alcalinidad de la ceniza total mL HCL 0.1 N/100 g	Máx. 0.7 cm ³
Índice crioscópico.	Máx. -0.540°C.
Sustancias conservadoras y cualquier otra sustancia extraña a su naturaleza.	Ausencia.
Prueba de alcohol (74% V/V Mínimo).	No coagulable
Prueba de la reductasa con azul de metileno.	Min. 4h.

Fuente: NTP 202.001.2003.

3.2.1.3. CALIDAD DE LA LECHE.

Una leche de buena calidad debe reunir las siguientes características: adecuada composición (contenidos de proteína, grasa, sólidos totales, minerales y vitaminas), no contener un número excesivo de microorganismos (<50.000 UFC/mL), estar libre de sustancias extrañas (calostro, sedimentos) y de residuos químicos e inhibidores (antibióticos, pesticidas y otros), ausencia de cuerpos extraños y de agentes patógenos (brucelosis, tuberculosis, paratuberculosis y *Salmonella*, entre otros), y poseer adecuadas características organolépticas (sabor y olor normales).^{19,20} Como indicadores de la calidad composicional de la leche, se toman los contenidos de sólidos totales, proteína y grasa, además existen componentes minoritarios que pueden ser determinantes en el comportamiento de la leche al momento de ser procesada y por lo que es de suma importancia cuando se pretende elaborar diferentes derivados.¹⁷

Factores que desmejoran su calidad

La leche es una sustancia que se contamina fácilmente debido a su composición química y a su elevada cantidad de agua, por lo tanto, una deficiente higiene durante el ordeño y el insuficiente cuidado en el tratamiento y almacenamiento, al igual que las enfermedades de la ubre desmejoran su calidad y la pueden convertir en un producto nocivo, además el uso de medicamentos, sumados al fenómeno de la contaminación ambiental hace que se puedan almacenar residuos de compuestos químicos o sus

metabolitos en tejidos u órganos animales, que al ser consumidos por la población humana pueden convertirse en un problema de salud pública. Por ello es necesario adoptar medidas de control para minimizar los riesgos de contaminación.²¹

3.2.2. MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE

La leche constituye un medio nutritivo ideal para los microorganismos ya que contiene todos los nutrientes necesarios para su crecimiento. Los microorganismos de importancia en la leche se pueden clasificar en tres grupos: bacterias, levaduras y mohos.²²

3.2.2.1. BACTERIAS “GRAM POSITIVAS +”

Son de diferentes géneros ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en el suelo y en cualquier lugar donde existan altas concentraciones de carbohidratos, proteínas, vitaminas y poco oxígeno, su forma puede ser bacilar, cocoide u ovoide llegando a soportar pH 4.0 en la leche, generalmente son anaeróbicas facultativas, mesófilos, termófilas y de crecimiento exigente. Pueden ser homofermentativas (más del 90% de su metabolismo resulta en ácido láctico) o heterofermentativas (producen además de ácido láctico, otros ácidos y gases).

3.2.2.1.1. Bacterias lácticas:

Son las bacterias más importantes en los productos lácteos, tanto por sus actividades bioquímicas, como por su número (proporción) en la microflora total y frecuencia en los exámenes microbiológicos, estas fermentan la lactosa dando una proporción elevada de ácido láctico en los productos de degradación. Su estudio en el ámbito tecnológico es importante debido a que son formadoras de textura y ayudan al establecimiento de las condiciones para la elaboración de ciertos productos lácteos, esto dado por el efecto de la acidez que producen al fermentar la lactosa, además ayudan a la coagulación gracias a la coalescencia de las caseínas al alcanzar el pH iso-eléctrico, lo cual es deseable en la elaboración de yogurt y quesos.

3.2.2.1.2. Micrococcus:

Estas bacterias son en general aerobias (hay algunas variedades anaerobias), no fermentan la glucosa sino que la degrada de forma oxidante sin provocar más que un débil descenso del pH (mínimo entre 5.0 y 5.5), este género no es patógeno. Forman parte de la flora inocua que contamina la leche y se encuentran frecuentemente después del ordeño, presentando una temperatura óptima bastante elevada (hacia 37°C), pero por sus actividades enzimáticas reducidas tienen poca importancia en los problemas referentes a la conservación y tratamiento de la leche, sin embargo influyen sobre el resultado de las pruebas de apreciación de la calidad bacteriológica de la leche que habitualmente se efectúan a 37°C.²³

3.2.2.1.3. Estafilococcus:

Son aerobios facultativos, fuertes fermentadores y son de gran importancia desde el punto de vista sanitario ya que son causantes de la mastitis en bovinos y provocan enfermedades o intoxicaciones en los humanos. El *Staphylococcus aureus* produce una exotoxina que causa fuertes trastornos intestinales en los humanos, esta toxina es termoresistente por lo cual no es destruida por la pasteurización.

3.2.2.1.4. Bacterias esporuladas:

Los bacilos son bacterias aeróbicas con actividad enzimática variada, producen acidificación, coagulación y proteólisis. Los *clostridium* son anaerobios estrictos, productores de gas y algunos producen toxinas patógenas en la leche cruda, como el *clostridium botulinum*. Su crecimiento es inhibido por las bacterias lácticas y cobran importancia en productos lácteos como en leche pasteurizada, quesos fundidos, leches concentradas, quesos de pasta cocida por ser resistentes a la pasteurización por su capacidad de producir esporas, los cuales solo se destruyen a temperaturas por encima de 100°C.

3.2.2.1.5. Diversas:

Otras bacterias gram positivas que pueden encontrarse en la leche son: *Corynebacterium*, *bacterias propionicas*, *Brevibacterium*, estas últimas se encuentran en la corteza de algunos quesos maduros almacenados en condiciones húmedas.

3.2.3. BACTERIAS “GRAM NEGATIVAS (-)”.

3.2.3.1. Enterobacterias:

Son huéspedes normales del intestino de los mamíferos, por lo tanto su presencia en el agua y en la leche se relacionan con contaminación de origen fecal, donde, la determinación de su presencia indica calidad higiénica de la leche cruda y pasteurizada.

Los géneros comunes en la leche cruda son: *E. Coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* y *Serratia*, estas bacterias tienen gran importancia desde dos puntos de vista:

- El higiénico: ya que varias de estas especies tiene poder patógeno, de los cuales las más temible es la *Salmonella* y otras que pueden provocar trastornos gastrointestinales (*Yersinia*, *E. coli*, *Shigella*).
- Tecnológico; ya que son bacterias heterofermentativas, grandes productoras de gases, y además producen sustancias viscosas de sabor desagradable lo cual conduce a la alteración de la leche o subproductos.²⁶

3.2.3.2. Acromobacterias:

Son aerobias saprófitas, que son parte esencial de la microflora psicrófila que prolifera en la leche conservada a bajas temperaturas produciendo sustancias viscosas ó coloreadas.

De estas se distinguen los siguientes géneros:

- ❖ *Alcaligenes* (que producen álcalis). Son bacilos que no fermentan los azucares pero, en cambio, producen reacciones alcalinas en especial en la

leche tornasolada. La leche fresca, los productos avícolas y materia fecal son fuentes corrientes de estos microorganismos. El *A. viscolactis*, produce viscosidad en la leche.²⁴

- ❖ *Flavobacterium*. Las especies de este género producen pigmentos de color variable del amarillo a naranja. Algunas especies son mesótrofos y otros psicrótofos.

3.2.3.3. Diversas:

- ❖ *Pseudomonas*. Estas bacterias son bacilos gram negativos generalmente inmóviles que son transportadas por aguas no potables y tierra, estas suelen formar parte de la microflora psicrófila de la leche donde se desarrollan a actividades de agua altas (0.97 a 0.98). El calor las puede destruir con facilidad y su crecimiento es escaso si no disponen de oxígeno o si la temperatura es superior a los 43°C, teniendo la ventaja de ser resistentes a la desecación.
- ❖ *Brucella*. Bacterias patógenas causales de la brucelosis (*B. abortus*).

3.2.3.4. Micobacterias:

Bacilo causante de la tuberculosis vehiculado por leche cruda, que presenta un aspecto filamentoso y afinidad con hongos.

3.2.2.1. LEVADURAS.

En la leche cruda suelen encontrarse células esféricas u ovaladas, no esporulantes que pertenecen al género *Candida* estas producen gas y poco o nada de alcohol. En las condiciones habituales no se manifiestan en la leche, solo excepcionalmente son causa de la leche espumosa y también pueden encontrarse en la leche levaduras esporulantes como el *Saccharomyces fragilis* y el *S. lactis* que fermentan la lactosa con producción de alcohol.²⁵

3.2.2.2. HONGOS.

Son microorganismos eucariotes, y pueden existir en dos formas morfológicas: los hongos filamentosos (crecimiento en hifas) y los hongos unicelulares (levaduras), ambas alternan las dos morfologías anteriores de acuerdo a las condiciones fisiológicas. Los mohos consisten de filamentos conocidos como hifas, estas se encuentran formando estructuras ramificadas conocidas como micelio, que tienen la apariencia de fibras de algodón y no tienen gran importancia en la leche líquida.

3.2.2.3. LOS MICROORGANISMOS Y LA LECHE.

Según Pascual, A. (1998), el desarrollo microbiano de la leche origina una serie de modificaciones químicas, también pueden estar presentes en la leche micotoxinas, procedentes de vacas que han consumido alimentos contaminados (aflotoxinas M, segregadas por *Aspergillus flavus*).²⁶

Posteriormente al ordeño y durante la conservación, el contenido microbiano de la leche sufre ciertas variaciones. En la primera hora que sigue al ordeño se produce una disminución de la flora, debido a la acción de las sustancias inhibidoras de la leche (lactenina, lactoperoxidas y lizozima), en especial una reducción de bacterias lácticas.²⁶

En una siguiente fase se produce un incremento de microorganismo, según la temperatura de conservación de la leche, si no se trata este crecimiento, se producen una serie de modificaciones fisicoquímicas en el producto. Se inicia a continuación una fase de acidificación, consecuencia de la fermentación de la lactosa para formar ácido láctico, el pH desciende 4.5-4, esta se da más o menos de forma rápida o lenta, según la especie microbiana que la origina y de las condiciones ambientales, principalmente la temperatura. El aumento de la acidez inactiva la acción de los fermentos lácticos, circunstancia que aprovechan los mohos (*geotricum*, *penicillium*) y otros gérmenes acidófilos para su desarrollo, pudiendo crecer entonces otras especies microbianas, aerobias y anaerobias, determinando un proceso de putrefacción que transforma la leche y hace variar sus caracteres organolépticas (olor, color, sabor). Entre estos procesos se tiene:

Agriado y acidificación con coagulo: Los gérmenes responsables son de tipo homo y heteroláctico entre los 10-37°C, los gérmenes que intervienen son *Streptococcus lactis* asociado, a veces, con coliformes, *enterococcus*, *micrococcus* y *lactobacilus*. Por encima de 37°C intervienen *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus faecalis* y *Lactobacillus bulgaricus*.²⁶

Proteólisis: esta alteración esta favorecida por el almacenamiento prolongado de la leche a baja temperatura y se manifiesta por su olor y una ligera alcalinización. La flora incriminada pertenece a los géneros: *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *clostridium*. Se puede producir una acidificación del coagulo y su digestión.²⁶

Leche filante: esta alteración también se puede producir por causas no bacterianas (exceso de crema, coagulación de la lactoalbúmina por calentamiento), por acción microbiana indirecta (paso de leucocitos y fibrina a la leche como consecuencia de una mastitis) y por acción microbiana directa. Se manifiesta por aumento de viscosidad que hace la leche filante.

3.2.3. MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE LA CARGA BACTERIOLÓGICA DE LOS PRODUCTOS LÁCTEOS.

3.2.3.1. Determinación de aerobios mesófilos: métodos de recuento en placa.

El número de microorganismos aerobios mesófilos (“Recuento en placa”) encontrados en un alimento ha sido uno de los indicadores microbiológicos de calidad sanitaria de los alimentos más comúnmente utilizado, esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración.²⁷ Sin embargo tiene valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas, por lo que un recuento total bajo no asegura que un alimento este exento de patógenos o sus toxinas,

tampoco un recuento total alto significa, inevitablemente, presencia de flora patógena.²⁶

También este índice no es, aplicable en los casos en que un proceso de fermentación, como ocurre en el queso y en ciertos tipos de embutidos, o de “maduración” natural, ya que da lugar a cifras muy elevadas de bacterias y tiene un valor limitado a la hora de juzgar la seguridad de los alimentos.³⁰

Permite también obtener información sobre la alteración incipiente de los alimentos, su probable vida útil, la descongelación incontrolada de los alimentos congelados o los fallos en el mantenimiento de las temperaturas de refrigeración en los alimentos.²⁷

3.2.3.2. Determinación de bacterias coliformes.

Son bacilos que han sido definidos en los métodos normalizados para el análisis de agua y leche como “aerobios y anaerobios facultativos, (tanto de origen fecal como de otra procedencia), son gram-negativos no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas y ácido a 32-35°C en 24-48 horas en medios sólidos o líquidos.²⁷

Las principales especies de bacterias coliformes son *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, y se han establecido diversos métodos para distinguir ambas especies ya que *E. coli* típico produce mucho ácido de la glucosa y ambas especies fermentan los azúcares con formación de ácido láctico, etanol, ácido acético, ácido succínico, dióxido de carbono e hidrógeno.²⁷ Se emplean con profusión recuentos de coliformes, coliformes fecales y de *E. coli* en

alimentos con carácter de indicador, donde, el número de colonias de las bacterias coliformes establece la calidad sanitaria del producto y considerando que este género se encuentra normalmente en el medio ambiente, se acepta una cierta cantidad de éstas en la leche, ya que la cantidad de bacterias de este tipo tiende a disminuir, no aumenta a bajas temperaturas y se elimina durante el tratamiento térmico.²⁷

Método del número más probable.

El método es de por sí estadístico, y los resultados del NMP generalmente son más elevados de los resultados del recuento estándar. En este método, se preparan diluciones de las muestras de alimentos de igual forma que en el método convencional de recuento en placa (SPC) y se siembran tres partes alícuotas o diluciones seriadas en 9 o 15 tubos de un medio apropiado según se trate de la técnica de 3 tubos o de la técnica de 5 tubos, respectivamente. El número de organismos en las muestras originales se determina usando las tablas normales del NMP.²⁷

3.2.4. ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA PECUARIA.

La FAO y la OMS en 1984, definieron al medicamento veterinario como “Cualquier sustancia aplicada o administrada a los animales productores de alimentos, tales como animales productores de carne, aves, pescados o abejas, con fines terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico, o de modificación de las funciones fisiológicas, y para la prevención y tratamiento de las

enfermedades.” Entre estas sustancias están: los antibióticos usados para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias.²⁸

3.2.4.1. Los antibióticos.

Definición: Término que comprende todas las sustancias antimicrobianas, ya sean derivadas de bacterias, de actinomices, de sustancias naturales o de productos químicos sintéticos.²⁹

Clasificación: Se ha utilizado diferentes criterios, entre los principales: biosíntesis, espectro de acción y estructura química. Según sean activos contra muchos o pocos grupos de microorganismos, se dividen en “de amplio espectro” o de “reducido espectro”.²⁹

Cuadro N° 03.

CLASIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS BETALACTÁMICOS Y TETRACICLINAS, MODO DE ACCIÓN Y ESPECTRO SIMPLIFICADOS.³⁰

Grupo	Miembros	Modo de acción	Espectro
Betalactámicos: <i>Penicilinas</i>	Penicilina G Penicilina V Cloxacilina Ampicilina Carbenicilina	Inhiben síntesis de pared. Idem Ídem Idem Idem	Bacterias G+ Idem. Estafilococos productores de penicilinas. Bacterias G+ y G-\. P. aeruginosa
Tetraciclinas:	Oxitetraciclina Doxiciclina Minociclina	Inhibe síntesis proteica porción 30S ribosomal. Idem Idem	Bacterias G+ y G-, Rickettsias, chlamydias y algunos protozoos Idem Idem

Fuente: Adaptado de FAO, 2004

3.2.4.2. ANTIBIÓTICOS Y SUS USOS EN EL GANADO BOVINO.

Los antibióticos se utilizan en los animales, para favorecer su crecimiento y para el tratamiento o prevenir infecciones causadas por bacterias.³⁰ Se describen las formas de utilización:

Fines terapéuticos: Los antibióticos más utilizados son las penicilinas, tetraciclinas, neomicina, bacitracina y estreptomina, entre otros. Estas se usan en forma terapéutica que quiere decir en el tratamiento de una infección documentada, esta es la forma ideal de tratamiento antimicrobiano que se basa en conocer el germen causal ya que muchas veces el tratamiento se comienza de forma empírica cuando se considera urgente la necesidad del mismo, pero siempre que sea posible es importante que se realicen cultivos pertinentes previos, antes de instaurar el tratamiento, para poder valorar a *posteriori* la eficacia de los antibióticos utilizados.³⁰

La profilaxia: Implica la utilización de medicamentos para la prevención de enfermedades en animales individuales o grupos de ellos. Estos antimicrobianos se usan a concentraciones subterapéuticas.³⁰

Como promotores de crecimiento: Los antimicrobianos promotores del crecimiento comúnmente se adicionan en el pienso o agua que consume el ganado vacuno, los pollos, pavos, cerdos, con el fin de mejorar la ganancia de peso y el índice de conversión de alimentos, estos se incluyen en el pienso a bajas concentraciones, en un rango entre 2,5 y 125 mg/Kg. de pienso dependiendo del agente y de las especies tratadas. Además de los beneficios

económicos, las principales ventajas para los ganaderos son la mayor uniformidad de crecimiento, estabilización de la flora intestinal en los animales, y mantenimiento de la salud en casos de estrés medioambiental, en un grado que se puede decir que estos antimicrobianos promotores de crecimiento actúan profilácticamente, es decir reducen la morbilidad.³¹

Cuadro N° 04:

ANTIMICROBIANOS AUTORIZADOS EN LOS EE.UU. PARA USO EN ANIMALES PRODUCTORES DE ALIMENTOS (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES COMMITTEE ON DRUG USE IN FOOD ANIMALS, 1999).³²

Objetivo	Antimicrobianos
Tratamiento de varias infecciones	Eritromicina, fluoroquinolona, gentamicina, neomicina, penicilina, espectinomicina, tetraciclinas, tirosina, virginiamicina.
Crecimiento y eficacia alimentaria	Bambermicina, bacitracina, clortetraciclina, penicilina, tilosina, virginiamicina

Fuente: Anadón, 2007.

3.2.4.3. Farmacocinética del antibiótico.

Para que el antibiótico logre una adecuada eficacia clínica, el fármaco debe llegar a los tejidos infectados en concentraciones superiores a las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de las bacterias (MIC). Al respecto, es importante recordar que la dosis, intervalo entre dosis y duración de la terapia señaladas por la industria farmacéutica para cada fármaco en particular son definidas a través de una serie de parámetros farmacocinéticos, que relacionan las concentraciones máximas que debe alcanzar el fármaco en sangre y

órganos dianas, en función del tiempo y las concentraciones Mínimas Inhibitorias de las bacteria. Después de administrar un medicamento a un animal, tiene lugar un proceso metabólico que favorece su eliminación; en términos generales la mayor parte del producto y de sus metabolitos se excretan por la orina y las heces.^{33, 34}

3.2.4.4. Factores que afectan la excreción mamaria de los antibióticos.

Existen diferentes factores que ayudan o interfieren con la excreción de los residuos de antibióticos por las ubres de las vacas que fueron tratadas. Entre ellos:

El principio activo: En Parra *et al.* (2003) se menciona que las sales benzatínicas de las penicilinas se eliminan por más tiempo (pueden eliminarse hasta por 20 a 30 días en la leche), que las sales sódicas y el porcentaje de macrólidos que pasa a la leche es 1% aproximadamente y 0,001% de las penicilinas. En los EEUU, la Food and Drug Administration (FDA), no aprueba ninguna penicilina benzatínica, ni para uso inyectable, ni de aplicación intramamaria en vacas lactantes.³⁵

El excipiente: Los antibióticos en vehículo acuoso se eliminan más rápido que los de vehículo oleoso. Una penicilina procaínica en vehículo oleoso, tendrá una duración de excreción de 125%, mayor que la misma penicilina en medio acuoso.³⁵

La dosis: Para una penicilina procaínica, una aplicación intramuscular que pase de 3 a 6 millones de UI, incrementa la excreción en 33%.³⁵

La vía de administración: La administración mamaria se elimina por los 4 cuartos mamarios y tiene una duración de excreción mayor que la vía intramuscular. Igualmente, las aplicaciones de antibióticos intrauterinos, producen residuos en la leche. En la administración vía oral se puede generar residuos dependiendo del metabolismo del antibiótico y de su absorción por la mucosa intestinal, existiendo algunos reportes de que el 61% de los casos positivos a residuos en leche se deben al uso de antibióticos intramamarios.

La duración del tratamiento: Siempre el tiempo de retiro para los antibióticos y demás medicamentos, debe ser con base en el último tratamiento.³⁶

Cuadro N° 05

TIEMPO DE ELIMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN EL CUARTO TRATADO.³⁷

Intervalo (horas) en que se elimina el antibiótico	Antibiótico
<=40	Amoxicilina
50-70	Bencilpenicilina, cefalexina, Cloxacilina
70-90	Ampicilina, lincomicina, Cefquinoma, Cefoperazona, penetamato
25-31	kanamicina, cefalexina, gentamicina
35-49	Amoxicilina, Cloxacilina, bencilpenicilina, lincomicina y Cefoperazona
62-74	Cefquinoma, ampicilina y penetamato

Fuente: Instituto lactológico Lekunberri, 2004.

3.2.4.5. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.

Las enormes diferencias que existen entre las células bacterianas y las células de los mamíferos, hacen que, en muchas oportunidades los blancos de los antimicrobianos en una bacteria, no existan en las células del hospedador o en todo caso, que esos blancos sean suficientemente distintos como para que las diferencias en afinidad sean tan marcadas que expliquen la acción selectiva sobre la bacteria. En definitiva la célula bacteriana es procariota (carece de núcleo desarrollado), a diferencia de los protozoarios, hongos o las células de animales superiores.³⁰

Los blancos de acción de los antibióticos se encuentran en diferentes regiones de la célula, que en general son consideradas las siguientes:

Inhibición de la síntesis de ácido fólico: Muchas bacterias necesitan ácido p-aminobenzoico (PABA) para sintetizar la coenzima esencial ácido fólico, como parte estructural de este ácido y como la molécula de PABA y la molécula de sulfamida (antibacteriano), son muy similares, estas últimas actúan compitiendo con el PABA bloqueando así la síntesis de ácido fólico.

Inhibición de la síntesis de la pared celular: Las drogas que atacan la pared bacteriana ejercen su efecto a través del bloqueo de su síntesis, e interfiriendo con la síntesis de peptidoglicano, elemento esencial de la constitución de la pared, provocan defectos de la pared celular llevan a la lisis bacteriana. Estas drogas actúan solamente frente a microorganismos que están en crecimiento

activo y pertenecen a este grupo: betalactámicos, gluco péptidos, bacitracina y estreptograminas.³⁰

Inhibidores de las funciones citoplasmáticas: Son productores de desorganización de la membrana celular, ocasionando la pérdida de sus propiedades, además son también una barrera de la síntesis de proteínas, ya que interfieren en diversos niveles del organoíde encargado de su elaboración que es el ribosoma. Dada la complejidad de este proceso, hay diversos blancos que son impactados por los diferentes agentes antiinfecciosos, en el caso de los aminoglucósidos y aminociclitoles actúan a nivel de la porción 30S del ribosoma, induciendo errores en la lectura de la información aportada por el ARN mensajero, de esta manera la proteína que se sintetice contendrá errores y no será útil. En el caso de las tetraciclinas, se unen al ribosoma en la porción 30S induciendo alteraciones de las membranas. Todos estos mecanismos, de una u otra manera, detienen o desvían la síntesis de proteínas.³⁰

Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleídos: Se conocen antibióticos que inhiben las funciones y la síntesis de ácidos nucleídos, de una de estas tres formas:

- Que interfieren con el metabolismo de nucleótidos.
- Que impiden la formación del molde de DNA.
- Interacción con el RNA polimerasas, que intervienen en la transcripción y replicación de ácidos nucleídos.

3.2.5. RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE.

Los residuos de antibióticos se definen como sustancias farmacológicamente activas (principios activos y excipientes, productos de degradación y metabolitos) que permanezcan en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiera administrado el medicamento veterinario. La concentración esperada está en función de diversos factores, como el grado de absorción del medicamento a partir del tracto gastrointestinal, la dosis administrada, la farmacocinética del producto y el tiempo de espera o retirada, de forma que una de las razones más obvias para que se produzcan residuos por encima de los límites legislados, o límites máximos de residuos(LMR) se debe a la no adecuada observación de los periodos de espera recomendados, bien de forma deliberada o accidental.²⁸

3.2.5.1. Normativa para los residuos de antibióticos en leche en el Perú.

El reglamento de inocuidad alimentaria DS N° 004-2011, indica que los límites de residuos en alimentos se basa a lo estipulado en el Codex alimentario que contempla los que puede contener la leche: límite máximo es 100 µg/L para la tetraciclina y 4µg/L para la penicilina G. (VER ANEXO N° 03).

3.2.5.2. Tiempo o período de retiro o supresión

El tiempo o de retirada, es el período de tiempo necesario entre la última administración del medicamento veterinario a un animal en condiciones normales de empleo y la obtención de productos alimenticios de dicho animal

a fin de proteger la salud pública garantizando que dichos productos alimenticios no contengan estos metabolitos. Los tiempos de espera se instauraron como medida de seguridad alimentaria para el consumidor.²⁸

3.2.5.3. RIESGOS DE LOS RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS PARA LA SALUD PÚBLICA

Cuando se consume alimentos provenientes de animales que fueron tratados con estos productos, en los cuales no se respetó el periodo residual antes de la faena, en la sangre y el cuerpo de los animales, las personas pueden ser intoxicadas.³⁸ Es importante señalar asimismo que pueden alterar la micro flora intestinal humana y contribuir al aumento de la resistencia de bacterias a antibióticos, tema de gran actualidad.³⁹ Según la FAO, (2004) clásicamente la presencia de antimicrobianos en alimentos se ha asociado a distintos problemas, a saber:

a. Alérgicos.

Los problemas alérgicos son conocidos y afectan a la población sensibilizada. En general las bajas concentraciones de antibióticos alergénicos (i.e. betalactámicos) no alcanzan para sensibilizar pacientes (aunque puede haber excepciones), pero sí para desencadenar reacciones que, en general, no son graves, aunque eventualmente pueden llegar a serlo (anafilaxia).³⁰

Algunos otros grupos de antibióticos son capaces de desencadenar reacciones alérgicas como las sulfamidas. De todas maneras siempre hay un componente

fuertemente individual en estas reacciones que está representado por el terreno inmunológico del paciente.

b. Tóxicos.

Los problemas toxicológicos, por su parte, son bastante difíciles de probar, dadas las bajas concentraciones residuales de estas drogas. Los aminoglucósidos, por ejemplo, son productos tóxicos y su ototoxicidad y nefrotoxicidad han sido clásicamente descritas; sin embargo, a concentraciones residuales es posible que no existan riesgos toxicológicos para este grupo de drogas. El que sí es capaz de dar lugar a problemas tóxicos es el cloranfenicol, y en este caso a dosis probablemente muy bajas este es capaz de producir dos tipos de manifestaciones toxicológicas: a. Una mielo-depresión dosis dependiente que se presenta en el curso de un tratamiento con la droga y b. Una anemia aplástica, que es dosis independiente, que desarrolla en individuos susceptibles, y que es irreversible una vez instalada.³⁰

c. Asociados a las resistencias bacterianas.

La resistencia bacteriana ha sido asociada largamente a la presencia de residuos de antibióticos en alimentos humanos, sin embargo y pensando lógicamente, las concentraciones residuales de antibióticos presentes en alimentos provenientes de animales tratados difícilmente sean capaces de seleccionar bacterias resistentes, dado que a tan bajas concentraciones los antibióticos no pueden actuar sobre microorganismos resistentes ni sensibles.³⁰

La resistencia bacteriana es un problema gravísimo que representa una preocupación mundial, que se produce por múltiples causas que probablemente sea inevitable y con la que tenemos que lidiar en forma multidisciplinaria a efectos de limitar su emergencia y paliar sus efectos al máximo. El riesgo más grande para la salud de los consumidores está dado por el desarrollo de resistencias en bacterias de los mismos animales, por supuesto, dar lugar a fallos terapéuticos en tratamientos veterinarios, y al riesgo de transferencia de bacterias resistentes de los animales al hombre, o de genes portadores de información que codifica resistencia de bacterias de animales a bacterias humanas.³⁰

3.2.5.4. IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA LÁCTEA.

En la leche destinada a la elaboración de productos lácteos (queso, yogurt, mantequilla) repercute en el desarrollo de microorganismos que provocan la fermentación de estos productos, por ejemplo, la acidificación se retrasa, la coagulación es deficiente o nula, la retención de agua disminuye, las características normales del producto se alteran (textura blanda, sabor amargo, consistencia arenosa en yogurt), e interferencia en la formación de aromas en la mantequilla. Esta serie de repercusiones provocan pérdidas tanto de calidad, como económicas.⁴⁰

Entre los microorganismos las bacterias lácticas son particularmente sensibles, a los antibióticos comúnmente usados en el tratamiento de mastitis, particularmente a la penicilina.^{41, 42} Los *Streptococos* mesófilos lácticos, son

parcialmente inhibidos a concentraciones de 0,1 ng/mL, y totalmente inhibidos a concentraciones de 0,2 ó 0,3 ng/mL. Los *Streptococcus thermophilus* y los *Lactobacillus*, son 10 veces más susceptibles a la penicilina, que los *Streptococcus* mesófilos.⁴³

3.2.5.5. Termoestabilidad de los antibióticos en leche

Aún persiste la creencia de que los tratamientos térmicos al que se somete a la leche cruda, destruyen las sustancias inhibidoras, en particular los antibióticos. Sin embargo, estudios realizados señalan que el tratamiento a 83 °C por 10 min produce una pérdida de actividad superior al 20% en cefalexina, cefuraxima y clortetraciclina. La pasteurización (60°C por 30 min) produce una leve inactivación sobre los betalactámicos (6-20%), solamente el 8% de actividad de la penicilina, y en las tetraciclinas (18-31%).⁴⁴ Con la esterilización se inactiva el 50% de la penicilina y la ebullición de la leche destruye el 90% de residuos de tetraciclina.

En muchas ocasiones la leche producida por vacas tratadas con antibióticos no es eliminada, y se destina a la comercialización en mercados, se mezcla con leche de buena calidad para evitar que los residuos sean detectados o se destina para procesos de industrialización. Esto nos lleva a pensar que no es una opción someter la leche contaminada a dichos procesos, ya que un litro de leche contaminada con antibióticos es capaz de contaminar otros dos mil litros de leche, aún si son sometidos a procesos de pasteurización.

Cuadro N° 06
TERMOESTABILIDAD Y TIEMPO DE ELIMINACIÓN DE
ANTIBIÓTICOS.⁴⁴

Termoestabilidad de algunos antibióticos % destrucción según el tratamiento térmico			
	Pasteurización	90° C/ 30 min	100 °C/ 30 min
Penicilina	8 %	20 %	50 %
Clortetraciclina	-	-	90 %
Oxitetraciclina	-	-	90 %

Fuente: Magariños H. 2000.

3.2.5.6. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS
EN LECHE

Según el *Codex Alimentarius*, los métodos se pueden clasificar según la información y detalles analíticos facilitados con respecto a la cuantía y al carácter del analito o analitos de interés.⁴⁵ Son de tres tipos:

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

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

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

3.2.5.7. PRUEBA SNAPDUO BETA-TETRA

Descripción y principio del test

Prueba comercial que detecta residuos de antibióticos del grupo betalactámico y de tetraciclina a concentraciones iguales o inferiores a los límites máximos de residuos establecidos por la FDA, ya que contiene un pellet conjugado reformulado patentado que detecta con precisión y fiabilidad los residuos antibióticos sin necesidad de calor o incubación, lo que le permite realizar

pruebas en leche fría, directamente en el camión, nevera o tanque y los resultados se obtienen en 6 minutos. Detecta tanto betalactámicos como tetraciclinas en una sola prueba. Laboratorios IDEXX de los Estados Unidos ha validado las pruebas en más de 30.000 dispositivos y para conseguir resultados óptimos cercanos a los límites máximos de residuos, no se recomienda el uso de un bloque calentador, todos los materiales de las pruebas SNAP se deben mantenerse en refrigeración a 2-8 °C cuando no se usaran. Está diseñada para su uso bajo condiciones ambientales normales (15-30°C), por lo que se debe procurar ejecutar el análisis en esos rangos.⁴⁶

CAPÍTULO IV: OBJETIVOS

➤ GENERAL:

Determinar la presencia de residuos de antibióticos y la carga microbiana, de la leche cruda que se expende en la ciudad de Iquitos.

➤ ESPECÍFICOS:

- 1.- Identificar y evaluar a las explotaciones pecuarias, sobre el manejo del ganado bovino y el uso de antibióticos en las vacas de producción de leche, de la ciudad de Iquitos.
- 2.- Determinar la presencia de residuos de antibióticos penicilina G y tetraciclina, por método cualitativo utilizando el kit SNAPduo™ Beta-Tetra ST Test, en muestras de leche cruda que se expende en la ciudad de Iquitos.
- 3.- Cuantificar la presencia de aerobios mesófilos, por el método de recuento estándar en placa (UFC/mL), en muestras de leche cruda que se expende en la ciudad de Iquitos.
- 4.- Cuantificar las bacterias coliformes (coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*), por el método del número más probable (NMP/mL) de la leche cruda que se expende en la ciudad de Iquitos.

CAPÍTULO V: HIPÓTESIS.

En la leche cruda de bovino que se expende en la ciudad de Iquitos habría presencia de antibióticos, y tendría una carga microbiológica alta.

CAPÍTULO VI: MÉTODO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

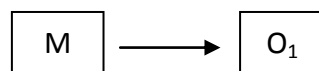
6.1. TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:

El **tipo de estudio** empleado fue el **Descriptivo**: porque el estudio describió e interpretó en forma clara y detallada los hechos obtenidos en la investigación, tal como se presentan en su contexto natural sin ejercer manipulación de las variables en estudio.

El **Método** fue el **cuantitativo**: porque los procedimientos de recolección, procesamiento y análisis de los datos a investigar son expresados numéricamente; dado a la aplicación de pruebas estadísticas (descriptivas) que permitieron probar la hipótesis planteada.

El **diseño** que se empleó fue el **longitudinal**: porque permitió realizar la recolección sistemática de las variables involucradas en función del tiempo, y existió periodo de seguimiento.

El diagrama del diseño es el siguiente:



Donde:

M: Muestra de estudio.

O1: Resultados de la medición de la(s) variable(s)

6.2. SELECCIÓN DEL ÁREA O ÁMBITO DE ESTUDIO:

El presente estudio se realizó en la ciudad de Iquitos que es la capital de la Provincia de Maynas y el Departamento de Loreto. Está rodeada por los ríos Amazonas, Nanay e Itaya, y está ubicado en el noreste de Perú, al noreste de departamento de Loreto, y en el extremo sur de la provincia de Maynas.

La ciudad misma con sus cuatro distritos (Belén, Punchana, San Juan Bautista e Iquitos) tiene una población de 422,055 habitantes.

El trabajo de recolección de muestras se dio en los expendios del distrito de Iquitos (zona urbana), y en las ganaderías de los centros poblados de Santo Tomas y Santa Clara (cuenca del río Nanay), ubicadas en el distrito de San Juan Bautista (zona rural); y además en la comunidad rural de Barrio Florido (Río Amazonas), perteneciente al distrito de Punchana.

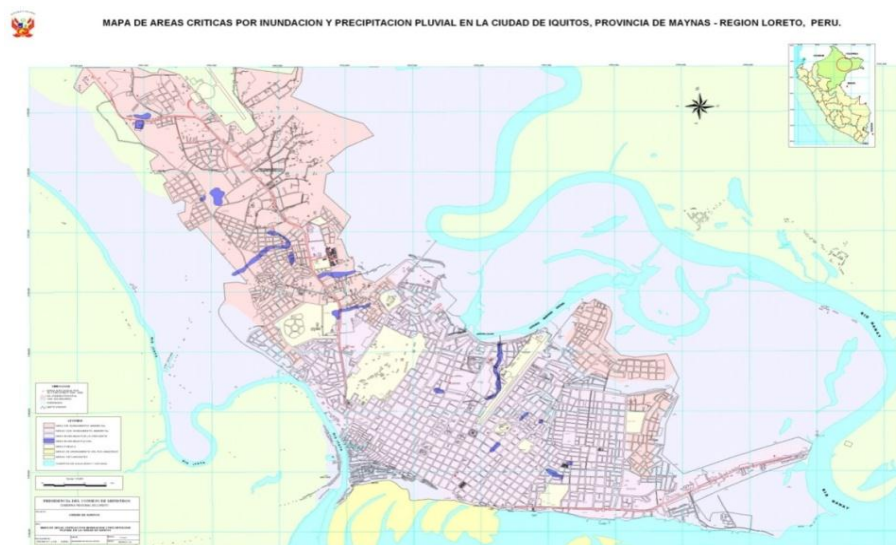


FIGURA N° 01: Ubicación geográfica de la ciudad de Iquitos, región Loreto-Perú.

6.3. POBLACIÓN Y MUESTRA:

- ✓ **Población:** Leche cruda de 4 ganaderías y puntos de expendios de la ciudad de Iquitos, que cumplan con el criterio de inclusión.
- ✓ **Muestra:** 1000 mL de leche cruda.

6.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:

Criterios de inclusión:

- ✓ Leche cruda de ganaderías que utilizaron antibióticos en el ganado productor en un periodo no mayor de 6 meses del comienzo de investigación.
- ✓ Leche cruda de expendios de la ciudad de Iquitos.
- ✓ Que comercialicen la leche en la ciudad de Iquitos.

Criterios de exclusión:

- ✓ Ganaderías que no utilizaron antibióticos en el ganado productor de leche.
- ✓ Leche cruda de ganaderías cuya producción es destinada al consumo propio.

6.5. DEFINICIONES OPERACIONALES

❖ **Variable independiente:**

Residuos de antibióticos: Se define como sustancias farmacológicamente activas (principios activos y excipientes, productos de degradación y metabolitos) que permanecen en la leche, a partir de animales al que se le hubiera administrado el medicamento.

Carga microbiana de la leche: Se define como la cantidad de microorganismos capaces de formar colonias (células viables) en la leche cruda.

❖ **Variable dependiente:**

Leche cruda: Leche obtenida del ordeño completo e higiénico de vacas sanas exenta de calostro y sustancias extrañas a su naturaleza con condiciones organolépticas normales y que no ha sido sometido a ningún tratamiento.

- a) **Apto:** negativo a antibióticos y carga microbiana debajo del límite máximo permitido.
- b) **No apto:** positivo a antibiótico y carga microbiana por encima del límite máximo permitido.

❖ **INDICADORES:**

- Análisis de antibióticos:
 - ✓ Concentración de penicilina G.
 - ✓ Concentración de tetraciclina.

- Análisis microbiológico:
 - ✓ Número de Aerobios mesófilos.
 - ✓ Número de Coliformes totales.
 - ✓ Número de Coliformes fecales.
 - ✓ Número de *Escherichia coli*.

❖ **ÍNDICES:**

- NTS N° 071.Minsa/Digesa v.01. “Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos para la vigilancia sanitaria de alimentos y bebidas de consumo humano”.⁴⁷

Leche cruda: **Aerobios mesófilos “m”: 10⁵ UFC/mL.**

Coliformes “m”: 10² NMP/mL.

- Codex Alimentarius, 2011. “Límites Máximos de Residuos para medicamentos veterinarios en los alimentos”.⁴⁸

Leche de vaca: **Penicilina G: 4 µg/L.**

Tetraciclina: 100 µg/L.

6.6. PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN.

Se consideró dos fases, con las siguientes actividades:

1) FASE DE CAMPO:

Como primera fase se realizaron una serie de visitas exploratorias a diferentes ganaderías, donde se pidió el permiso correspondiente al encargado y se expuso la necesidad de obtener información para el desarrollo de la investigación, con la recolección de las muestras de leche e información en general sobre el uso de medicamentos antibacterianos en su ganado bovino productor de leche.

En estos lugares se aplicó un cuestionario (VER ANEXO N° 01), el cual se diseñó para obtener de forma discreta los datos referentes al uso, frecuencia, tipo de los fármacos utilizados dentro del hato lechero.

Luego de éstas visitas se seleccionaron aquellas explotaciones que cumplieran con las características deseadas, y las que por motivos logísticos eran las más adecuadas.

Toma de muestras

Se utilizó en este estudio los métodos estándar de la federación internacional de lechería (FIL-IDF 50B 1995)⁴⁹ para la toma de muestra de las ganaderías, y del MINSA/DIGESA, 2001.⁵⁰ para la toma de muestra de los expendios.

Las muestras se tomaron por triplicado en tres fechas diferentes de cada ganadería y expendio, con un intervalo de 4 muestras cada 15 días.

De las ganaderías, las muestras fueron tomadas de tarros de almacenamiento, dentro de las primeras horas post ordeño, con el siguiente procedimiento: primero se mezcló vigorosamente aproximadamente 20 veces mediante el agitador (previamente esterilizado y conservado en bolsas de polietileno de primer uso, hasta el momento del muestreo), para asegurar un reparto uniforme de la materia grasa evitando el batido de esta. Luego de la agitación se utilizó cucharones de acero inoxidable (con el formato según se muestra en la FOTO N° 02), el mismo que fue esterilizado, se tomó la cantidad necesaria y se colocaron en los envases estériles, se rotuló y se conservó en los termos pre enfriados con el refrigerante para su transporte. (VER FOTO N° 03)



FOTO N° 01- Agitador



FOTO N° 02-Cucharon para muestreo.

De los lugares de expendio al público, se tomaron las muestras en las mismas condiciones (bolsas plásticas) en la que son distribuidos en el punto de venta y se realizó dentro de la primera hora de venta aproximadamente entre las 4 - 4:30 pm. Fueron rotulados, almacenados y transportados en refrigeración en termos pre enfriados.

Preservación, almacenamiento y transporte de muestras.

La temperatura de almacenamiento de las muestras estuvo comprendida entre 0-4 °C el cual se midió y comprobó con un termómetro antes del muestreo, y se transportaron hacia el laboratorio dentro de las 3 horas después del muestreo.



FOTO N° 03-Transporte de muestras de leche hasta el laboratorio para su procesamiento.

2) FASE DE LABORATORIO:

Se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Y se analizaron 24 muestras de leche proveniente de expendios y ganaderías.

A. DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIOLÓGICA.

Primero se realizó el análisis microbiológico para determinar la carga microbiana de la leche, y se utilizó la metodología descrita por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos (ICMSF)²⁷, para la enumeración de: bacterias aerobios mesófilos por recuento estándar en

placa; y para coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica del número más probable.

✓ **Preparación y reconstitución de medios de cultivo.**

Los medios de cultivos que se utilizaron en el análisis fueron preparados, horas previas a la llegada de la muestra de leche al laboratorio. Y se reconstituyeron con agua destilada, diluyendo la cantidad indicada por el fabricante. Se pesaron los gramos necesarios del medio deshidratado en una balanza analítica de 0.01 gr de precisión y se colocaron posteriormente en un Erlenmeyer o vaso de precipitado, se calentó hasta la ebullición o hasta que estuviera completamente disuelto, se cubrió con algodón y papel aluminio para posteriormente esterilizarlo en el autoclave a 121 °C a 15 libras de presión por 15 minutos.

✓ **Examen del envase**

A la llegada de las muestras al laboratorio, se controló la integridad, el estado de conservación e higiene de los envases de recolección, asegurándose de que no tuvieron fugas y suciedad que pueda alterar la microflora bacteriana.

✓ **Homogenización de la muestra para el análisis.**

Se llevó la muestra a la temperatura del laboratorio (20-25°C) y se homogenizó invirtiendo repetidamente (20-25 veces) el recipiente o trasvasando (sin agitación fuerte para evitar la formación de espuma), a los efectos de distribuir bien la grasa.

1°. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILOS.

- Primero se prepararon las muestras de leche por homogenización y diluciones. Se homogenizo según la ISO siguiendo lo descrito en la sección anterior. Luego se tomó 10 mL de leche con una pipeta estéril y se traspasó a un frasco conteniendo 90 mL de agua peptonada al 0,1%, y se homogenizo por 30 segundos con movimientos de rotación evitando la creación de espuma, así se obtuvo la dilución 10^{-1} . De la dilución 10^{-1} se tomó una alícuota de 1 mL y se traspasó a un tubo de ensayo conteniendo 9 mL del diluyente estéril y se llevó al aparato vortex durante 30 segundos para formar la dilución 10^{-2} , y así hasta formar las diluciones sucesivas, hasta la 10^{-4} . (VER FOTO N° 06 y 07).
- Una vez preparadas las diluciones de las muestras, se pipetearon por duplicado en placas de Petri, alícuotas de 1mL de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , lo que supuso la siembra por placa de 10^{-1} a 10^{-4} g. de alimento. (VER FOTO N° 08).
- El agar Plate Count se fundió en la hornilla eléctrica, utilizando agua hirviendo procurando que este tratamiento térmico no sea excesivamente prolongado. Una vez fundido se llevó al baño maría para templarlo a 44-46°C, controlando cuidadosamente su temperatura para que al mezclarlo con la dilución del alimento no sean inactivados los gérmenes (VER FOTO N° 05). Con la temperatura correcta, se vertió inmediatamente en las placas de Petri aproximadamente de 10 a 15 mL de medio fundido y templado.

Acto seguido, se mezcló el inóculo con el medio, inclinándolo y girando las placas.

- Con el fin de controlar la esterilidad se preparó una placa conteniendo medio de cultivo y el diluyente sin inocular.
- Una vez solidificado el agar, se invirtió las placas para incubarlas a 35 °C durante 48± 3 horas.
- Después del tiempo recomendado de incubación se procedió al recuento estándar en placa utilizando el contador de colonias con registro automático.(VER FOTO N° 11)

Cálculo del recuento estándar en placa

- Se eligió las dos placas correspondientes a la dilución más alta que presentaron entre 30 y 300 colonias y se contaron todas las colonias de cada placa utilizando el contador de colonias y el dispositivo de registro automático.
- Se calculó la media aritmética de los dos valores obtenidos y se multiplico por el factor de dilución (la inversa de la dilución cuyas placas han sido seleccionadas).

Formula:

$$R = \frac{x_1 + x_2}{2} \times \text{factor de dilución}$$

Donde:

R= recuento estándar en placa.

x₁=placa número 1.

x₂=placa número 2.

2°. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES.

Se utilizó la técnica del Número más probable*.

- La homogenización y preparación de las diluciones se realizó en paralelo al método de aerobios mesófilos por lo tanto se usaron los blancos de diluciones de alimentos. De estos se tomaron 1 mL de cada una de las diluciones $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ y se inocularon a tubos conteniendo 10 mL de caldo Lauril sulfato triptosa, utilizando tres tubos por cada dilución (9 tubos en total).
- Se llevó los tubos inoculados a incubación a 37°C durante 24 y 48 horas. Después de pasadas las 24 primeras horas se anotaron los tubos que mostraron producción de gas[†], y se volvió a la estufa los tubos negativos para su incubación durante 24 horas más. Pasados las 48 horas, se anotaron los tubos que mostraron producción de gas.
- Se eligió la dilución más alta en la que resultaron positivos a gas los tres tubos, y las dos diluciones superiores más próximas.
- Para confirmar que los tubos de caldo lauril sulfato triptosa, seleccionados son positivos de organismos coliformes, se transfirió con un asa de aro de cada tubo positivo a gas, a tubos de caldo lactosa bilis (2%) verde brillante (VER FOTO N° 09). Y fueron llevados a incubación a 37°C durante 48 horas para observar la producción de gas. La producción de gas confirmó la presencia de organismos coliformes. (VER FOTO N° 12)

*Método norteamericano descrito en ICMSF, 2000.

[†]Seleccionar los tubos gas positivo y seguir el procedimiento descrito en el método 3° de la sección sobre determinación de coliformes de origen fecal.

- Se anotó el número de tubos confirmados como positivos de organismos coliformes de cada dilución y se comparó con las tablas del número más probable (VER ANEXO N° 06).

3°. DETERMINACIÓN DE ORGANISMOS COLIFORMES DE ORIGEN FECAL*.

En esta técnica se tomaron los tubos de caldo Lauril sulfato triptosa gas positivos, procedentes del método 2. Y se inocularon con un asa de aro, hacia tubos conteniendo 10 mL de caldo EC.(VER FOTO N° 10)

Los tubos de EC se llevaron a incubación a 44,5-45°C en baño maría, durante 24 y 48 horas.

Luego de la incubación se verifico la producción de gas, y se dice que los tubos de caldo EC que presentaron gas, son también positivos de organismo coliformes de origen fecal.

Calculo del NMP

Se comparó las diluciones de los tubos gas positivo con las tablas del número más probable.

*Método norteamericano descrito en ICMSF, 2000.

4°. DETERMINACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI*

Aislamiento y purificación de cultivos

Se sembró por estría con un asa de aro, de cada tubo de caldo EC gas positivo del método anterior (sección sobre determinación de organismos coliformes de origen fecal), en placas de agar Endo, utilizando una placa para cada tubo y se incubaron invertidas durante 24 horas a 37°C. Después de las 24 horas se resembró las colonias por estría en una placa de agar nutritivo, estas se llevaron a incubación a 37°C por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se seleccionaron las colonias individuales y se sembró en agar nutritivo inclinado y se incubaron durante 24 horas a 37°C. (VER FOTO N° 13 y 14).

Luego de aislar y purificar los cultivos se inocularon los medios IMViC que se mencionan a continuación, para ello se utilizó un asa platino y se hizo las siembras a partir de cultivos que crecieron en el agar nutritivo inclinado a 37°C durante 24 horas.

Técnica para la prueba del indol.

- 1.- De los tubos inclinados de agar nutritivo se inocularon a tubos conteniendo 5 mL de caldo triptona a partir de cultivos puros y se incubó los tubos sembrados a 37°C durante 24°C.
- 2.- Pasado el tiempo de incubación se añadieron a cada tubo 0,2-0,3 mL del reactivo para el indol y se agitó en el aparato de vortex durante 15 segundos.
- 3.- Se esperó 10 minutos y observó los resultados, un color rojo oscuro en la superficie de la capa de alcohol amílico, indica que la prueba es positiva,

un color naranja indica la presencia de escatol y se anotó como reacción±.

(VER FOTO N° 15)

a) Técnica para la prueba del rojo de metilo.

- 1.- Se inoculó los cultivos puros hacia tubos de caldo glucosa tamponado y se llevaron a incubación a 37°C durante 5 días.
- 2.- Luego de los 5 días de incubación, se pipeteo 5 mL de cada cultivo en tubos vacíos y se añadió a cada tubo 5 gotas de la solución de rojo de metilo y se agitó.
- 3.- El color rojo bien definido indico reacción positiva y como negativo el color amarillo. Colores intermedios indicaron reacción dudosa

b) Técnica para la prueba de Voges-Proskauer.

- 1.- Se inoculó los cultivos puros hacia tubos conteniendo caldo glucosa tamponado, y se incubó a 37°C durante 48 horas.
- 2.- Pasado el tiempo de incubación se pipeteó 1 mL de cada cultivo en tubos vacíos y se añadió a cada uno de ellos 0,6 mL de la solución de naftol y 0,2 mL de la solución de hidróxido potásico.
- 3.- Se agitaron los tubos y se dejaron en reposo durante 2-4 horas. La aparición en la mezcla de un color rosa a carmesí se anotó como prueba positiva. (VER FOTO N° 17)

c) Técnica para la prueba del citrato sódico.

- 1.- Se sembró con cultivos puros hacia tubos conteniendo agar citrato Simmons inclinado, utilizando un alambre recto para sembrar por picadura en la columna de agar y por estría en la superficie inclinada. Fue un inóculo pequeño, ya que de otro modo la transferencia de nutrientes con el inóculo podría invalidar la reacción.
- 2.- Se llevó a incubación el agar citrato Simmons a 37°C durante 48 horas.
- 3.- El crecimiento visible (cambio de color verde claro del medio al azul) se considera reacción positiva y como negativa cuando no hay crecimiento.
(VER FOTO N° 16)
- 4.- Se comparó los resultados de las cuatro pruebas con la tabla de diferenciación de coliformes. (VER ANEXO N° 07)
- 5.- Y luego de diferenciada la cepa de E. coli se comparó las diluciones de los tubos positivos con las tablas del número más probable. (VER ANEXO N° 08)

B. PRUEBA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS

El análisis de antibióticos se realizó usando el método cualitativo: kit SNAPduo™ Beta-Tetra ST Test, este fue conservado en refrigeración a aproximadamente 2-8°C hasta el día de uso. Se llevó la temperatura de la muestra a 0-10 °C, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Antes de empezar

- El espacio de trabajo fue limpiado, asegurando que esté libre de residuos de fármacos.
- Se sacó al kit de refrigeración y se a tempero a 15-20°C.
- Una vez alcanzada la temperatura adecuada, cuidadosamente con la tijera se abrió el paquete que contiene al kit.
- Se cercioró que la pastilla del conjugado estaba en el fondo del tubo de muestra, caso contrario con suaves golpes se devolvió a la pastilla al fondo.

Paso 1: Preparado de la muestra.

- Con la pipeta se extrajo la muestra de leche homogenizada, hasta la línea indicadora ($450 \mu\text{L} \pm 50 \mu\text{L}$), y se agrego al tubo para muestras. (VER FOTO N° 19).
- Luego cuidadosamente se agito el tubo de lado a lado 3-4 veces hasta disolver la pastilla de reactivo.

Paso 2: Ejecución de la prueba.

- Dentro de los 15 segundos de la muestra mezclada, se vertió todo el contenido del tubo de muestras en el pocillo de muestras del dispositivo SNAP. (VER FOTO N° 20)
- A medida que el borde del círculo de activación comienzo a desaparecer, se presiono firmemente hacia abajo hasta oír un sonido característico.
- Luego del sonido se cronometro durante 6 minutos, después de este tiempo se leyó los resultados.

Lectura de resultados:

- ✓ **Positivo a penicilina G:**Cuando el punto beta es de color azul más oscuro que el punto de control y el punto tetra.
- ✓ **Positivo tetraciclina:**Cuando el punto tetra es de color azul más oscuro que el punto de control y el punto beta.
- ✓ **Positivo penicilina G y tetraciclina:** Cuando el punto beta y tetra es de color azul más claro que el punto de control.
- ✓ **Negativo a ambos antibióticos:**Cuando el punto beta y tetra son de azul más oscuro que el punto de control.Cuando el punto beta y tetra tienen exactamente el mismo color.

CAPÍTULO VII: CONTROL DE CALIDAD Y BIOSEGURIDAD

La Información se recolectó usando las fuentes primarias y secundarias.

Entre las fuentes primarias esta: el cuestionario llevado a cabo para conocer que productores usan antibióticos en el ganado productor de leche y la leche muestreada de aquellos. Las fuentes secundarias incluyen la documentación relacionado al proceso de análisis (certificado de análisis de los kits y guía de ejecución), que servirán de medios de desarrollo y verificación de la información obtenida, mediante la aplicación de las evaluaciones..

Además se tomaron las medidas necesarias para garantizar una buena calidad de los resultados y la seguridad de los investigadores ya que se siguió lo estipulado en las normas de bioseguridad del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la UNAP que está basada en las normas del Instituto Nacional De Salud-INS.

CAPÍTULO VIII: ANÁLISIS DE DATOS

Técnicas de análisis e interpretación de la información

El análisis e interpretación de la información se realizó empleando la estadística descriptiva para el análisis univariado calculando las medidas de resumen para luego describir lo que expresa la información.

- a) Para datos cualitativos: tablas de frecuencias y porcentajes
- b) Para datos cuantitativos: media, desviación típica, valores máximos y mínimos o rangos.

CAPÍTULO IX: ASPECTOS ÉTICOS

Fueron respetados los derechos como personas de los responsables de cada ganadería que participaron en el estudio, así mismo se tuvo en cuenta los siguientes aspectos:

- La confidencialidad de la información.
- La información recolectada fue procesada y analizada en forma agrupada en ningún momento se difundió información individual.

El investigador actuó durante el desarrollo del estudio, con responsabilidad, puntualidad y respetando lo acordado.

• CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN OBTENIDA.

Se tuvo en cuenta la anonimidad de los nombres de los lugares de expendio y ganaderías, en el momento de la recolección de datos. Los datos recolectados a través del cuestionario fueron utilizados solamente para fines de investigación. Una vez finalizada el proceso de análisis e interpretación de los resultados fueron destruidos.

CAPÍTULO X: MATERIALES

❖ Infraestructura:

- ✓ Laboratorio de microbiología de alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias.

10.1. Identificación y evaluación a las ganaderías sobre uso de antibióticos en las vacas de producción de leche.

- ✓ Hojas impresas con la encuesta.
- ✓ Bolígrafo.
- ✓ Tablero de apuntes.
- ✓ Libreta de apuntes.
- ✓ Cámara fotográfica.

10.2. Muestreo de leche:

- ✓ Frascos con tapa rosca asépticos.
- ✓ Cucharon.
- ✓ Agitador.
- ✓ Termo.
- ✓ Refrigerante.
- ✓ Rotulador.
- ✓ Etiquetas.

10.3. Determinación de antibióticos:

- ✓ Tijeras.
- ✓ Kit SNAPduo™ Beta-Tetra St.

- ✓ Pipetas de 450 μ L (incluidas en el kit).
- ✓ Guantes estériles.
- ✓ Tubo con pastilla reactiva.

10.4. Determinación de bacterias aerobios mesófilos, coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*.

Medios de cultivo y reactivos:

- ✓ Agar Citrato Simmons.
- ✓ Agar Endo.
- ✓ Agar Nutritivo.
- ✓ Agar Plate Count.
- ✓ Agua desionizada.
- ✓ Agua peptonada estéril 0,1%.
- ✓ Alcohol etílico 70° y 96°.
- ✓ Caldo E.C.
- ✓ Caldo lactosa bilis (2%) verde brillante.
- ✓ Caldo Lauril sulfato triptosa.
- ✓ Caldo MR-VP. glucosa tamponado.
- ✓ Caldo Triptona.
- ✓ Hidróxido potásico al 40%.
- ✓ NaCl.
- ✓ α -Naftol.
- ✓ Reactivo para indol.
- ✓ Solución de rojo de metilo.

Materiales de vidrio*:

- ✓ Bagueta.
- ✓ Erlenmeyer 50, 100, 250, 500 mL.
- ✓ Pipetas bacteriológicas de 1, 5 y 10 mL
- ✓ Placas Petri estériles de 10 y 25 mL.
- ✓ Probetas de 25, 100,500 mL.
- ✓ Termómetro.
- ✓ Tubos de ensayo 5 y 7 mL.
- ✓ Tubos de vidrio con tapa rosca de 10 mL
- ✓ Vaso de precipitado 250, 500,1000 mL.

Materiales de metal:

- ✓ Asa de inoculación de aro con alambre de nicrom o de platino-iridio.
- ✓ Asa de inoculación recto
- ✓ Gradilla metálica.

Equipos:

- ✓ Autoclave SELECTA.
- ✓ Balanza analítica SARTORIUS
- ✓ Baño termostático SELECTA PRESISTERM.
- ✓ Cocina eléctrica.
- ✓ Contador de colonias con registro automático.

*Los materiales de vidrio fueron previamente esterilizados con calor seco a 180°C durante 2 hr.

- ✓ Desionizador de agua marca OPTIC IVYMEN SISTEMN AC-L8.
- ✓ Estufa SELECTA.
- ✓ Incubadora microbiológica MEMMERT.
- ✓ Mechero de Bunsen.
- ✓ Refrigeradora FRIOLUX.
- ✓ Vortex MIXER MODEL VM-1000.

Otros materiales:

- ✓ Algodón
- ✓ Gorro.
- ✓ Mascarillas
- ✓ Papel aluminio.

CAPÍTULO XI: RESULTADOS

Organización de los resultados

Los resultados se organizaron para su presentación de la siguiente manera:

- a) Resultados de la encuesta realizada.
- b) Análisis descriptivo: determinación de los residuos de antibióticos en la leche cruda que se expende en la ciudad de Iquitos, durante el año 2013.
- c) Análisis descriptivo: determinación de la carga microbiológica de la leche cruda que se expende en la ciudad Iquitos, durante el año 2013.
- d) Muestras aptas y no aptas.

11.1. RESULTADO DE LA ENCUESTA REALIZADA EN LAS GANADERÍAS.

La realización de la encuesta fue hecha con el fin de conseguir información importante respecto al manejo en general de cada ganadería, además de obtener información sobre antibióticos suministrados a los animales enfermos, y el tratamiento que se le daba a la leche luego de su extracción, además de otros puntos que no serán mencionados a continuación por su irrelevancia respecto al tema de investigación.

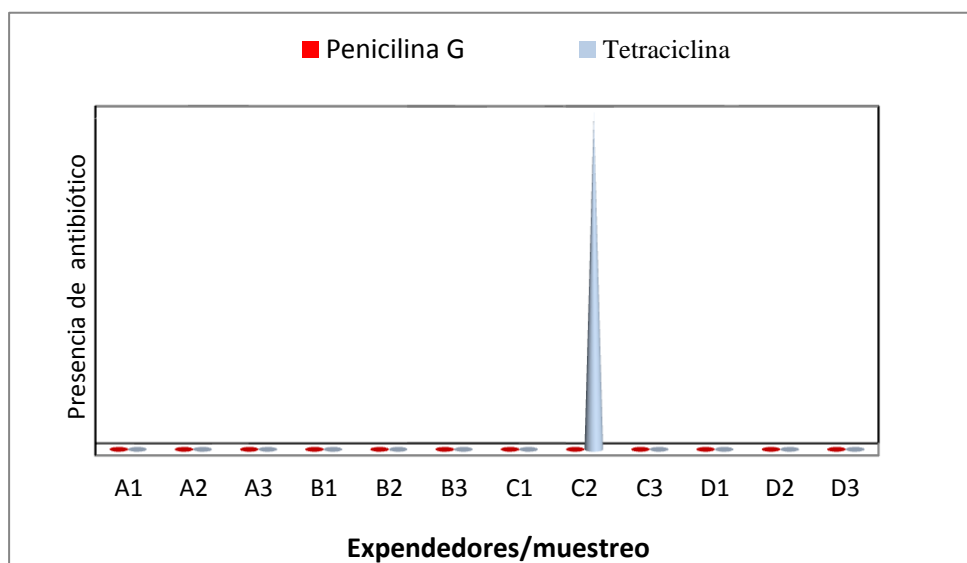
TABLA N° 07: Resultados de la encuesta realizada en las ganaderías

PREGUNTA	Ganadería W	Ganadería X	Ganadería Y	Ganadería Z
¿Cuáles son las enfermedades que se presentan más comúnmente?	Hongos, mastitis	Mastitis, Diarrea	Diarrea, mastitis, prolapso, Brucelosis, TBC	Diarrea.
¿Cuáles son los fármacos que se utilizan para tratar las enfermedades? (antibióticos)	ampolla Bencilpenicilina procaínica.	ampolla de Penicilina.	Ampolla de Penicilina. Oxitetraciclina	Ampolla de Penicilina.
¿El ordeño es manual o mecánico?	Manual	Manual	Manual	Manual
¿Cuántos ordeños se realizan al día?	1	2	1	1
¿A qué horas se realiza el ordeño?	4 de la mañana	6 de la mañana y 3 de la tarde	4 de la mañana	4:30 de la mañana
¿Cuántas vacas están en producción?	30	17	20	6
¿Tiene asistencia Médico Veterinaria? (actividades)	No	Si, una vez al mes. Revisión del ganado.	Si, una vez al mes. Revisión del ganado y otros	Si, una vez al mes. Revisión del ganado y otros.
Tratamiento de la leche post ordeño	Mañana: Se entrega una hora después.	Mañana: Se entrega una hora después. Tarde: Se entrega una hora después.	Mañana: Se entrega una hora después.	Mañana: Se entrega una hora después.

11.2. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

GRÁFICO N° 01

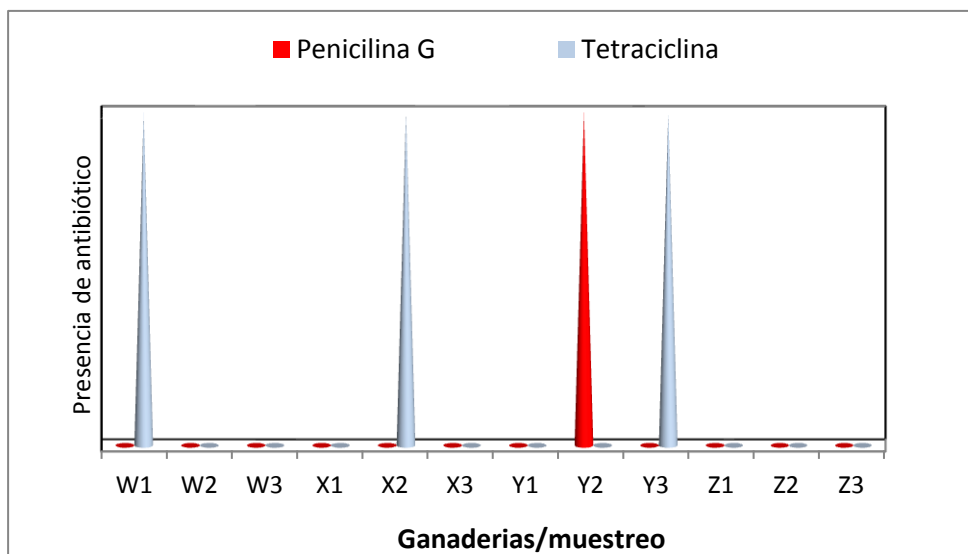
PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE CRUDA DE 4 EXPENDEDORES DE LA CIUDAD DE IQUITOS, 2013.



El gráfico N° 01, muestra que de las ganaderías: A, B, C y D, se encontró presencia de tetraciclina en la muestra de C (muestra C₂), y teniendo en cuenta la sensibilidad del kit, reportó tetraciclina con concentraciones iguales o mayores a 100 µg/L. No se detectó residuos de penicilina.

GRÁFICO N° 02

PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE CRUDA DE 4 GANADERÍAS DE IQUITOS, 2013.

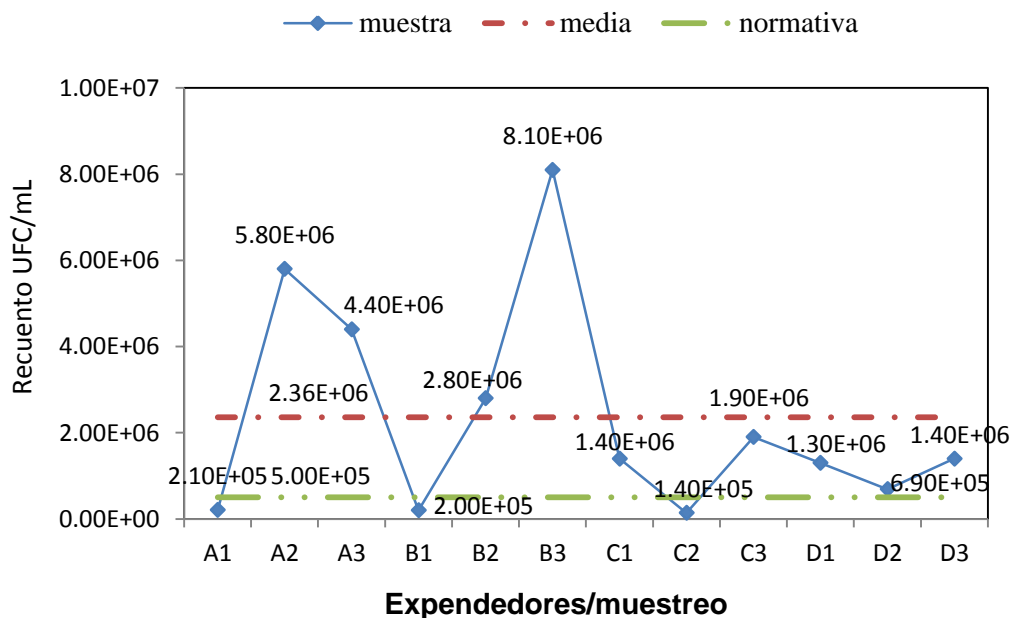


El gráfico N° 02, muestra que se detectó 3 muestras de leche cruda positivas a tetraciclina (W1, X2, Y3), y penicilina en 1 muestra (Y2).

11.3. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE CARGA MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE CRUDA

11.3.1. AEROBIOS MESÓFILOS

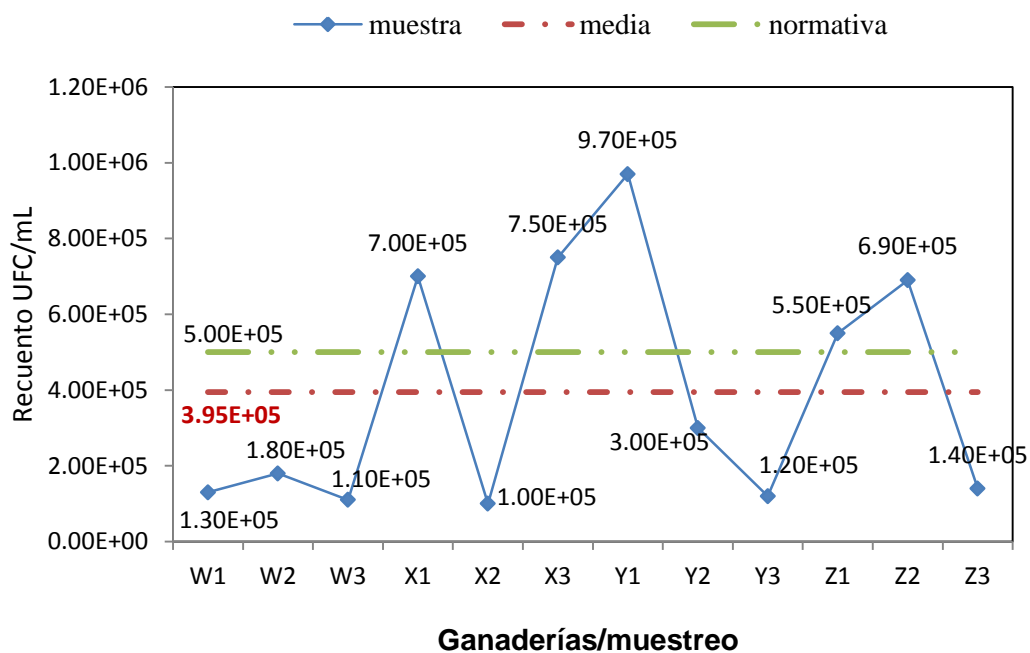
GRÁFICO N° 03
 RECUENTOS DE AEROBIOS MESÓFILOS EN MUESTRAS DE LECHE CRUDA DE EXPENDEDORES DE IQUITOS, 2013.



El gráfico N° 03, muestra los recuentos de aerobios mesófilos en 12 muestras tomadas de expendios, donde 9 (75%) estuvieron por encima de la norma sanitaria y 3 muestras (25%) resultó por debajo. Estos recuentos no se mantuvieron parejos en ninguno de los casos, con excepción del expendedor D que mostró recuentos más parejos pero por encima de la norma.

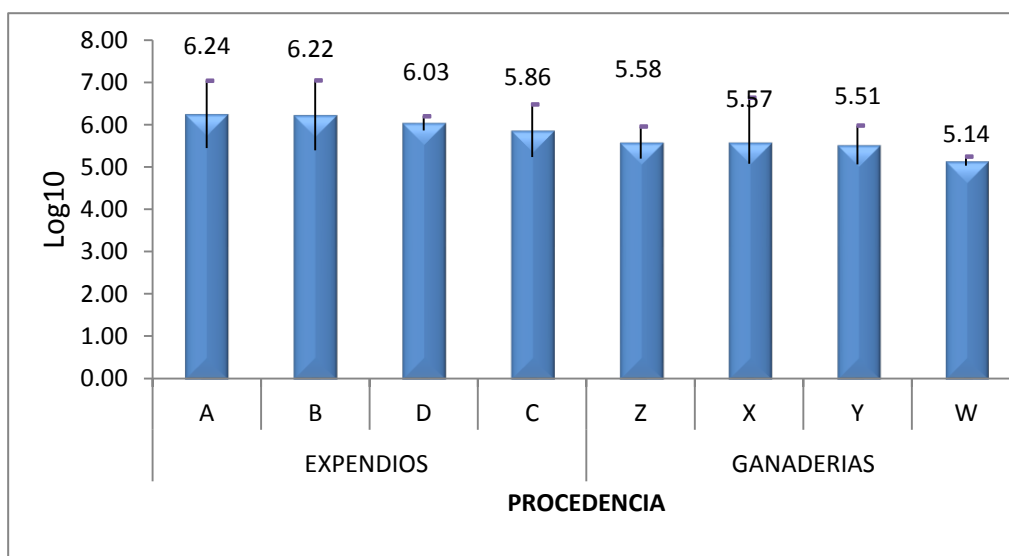
GRÁFICO N° 04

RECuentos de Aerobios Mesófilos en Muestras de Leche Cruda de 4 Ganaderías de la Ciudad de Iquitos, 2013



El gráfico N° 04, muestra que de las 12 muestras de leche analizadas, se obtuvieron 5 muestras (41,6%) por arriba de la norma sanitaria y 7(58,3%) por debajo.

GRÁFICO N° 05
PROMEDIOS (LOG₁₀) DE AEROBIOS MESÓFILOS EN LECHE CRUDA
SEGÚN PROCEDENCIA QUE SE EXPENDE EN LA CIUDAD DE
IQUITOS-PERÚ, AÑO 2013



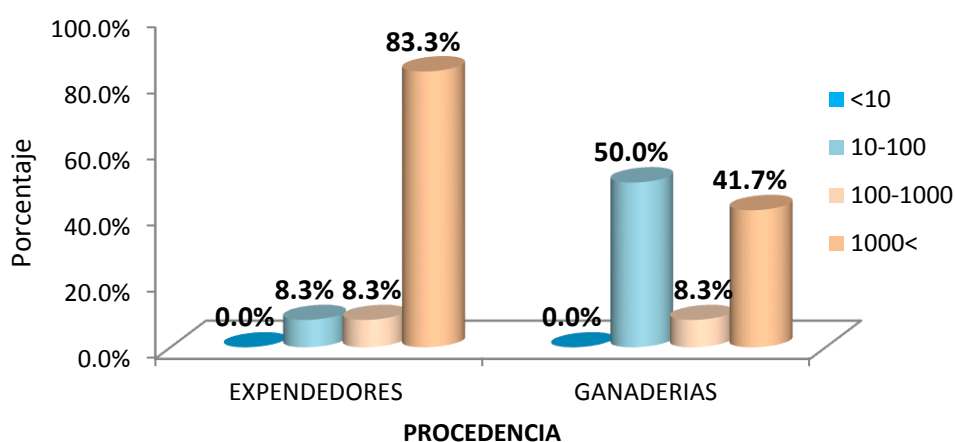
Las barras de error son la desviación estándar.

El gráfico N° 05, muestra los promedios obtenidos de los recuentos de la leche de cada establecimiento. De los expendios (A, B, C, D) estuvieron entre 6.24-5.86 (Log₁₀) que en todos los casos estuvieron por encima de la norma que es 5.7 (Log₁₀). De las ganaderías (W, X, Y, Z) se puede observar que los promedios estuvieron entre 5.57-5.14 (Log₁₀).

11.3.2. BACTERIAS COLIFORMES TOTALES

GRÁFICO N° 06

NÚMERO MAS PROBABLE DE COLIFORMES TOTALES EN LECHE
CRUDA QUE SE EXPENDE EN LA CIUDAD DE IQUITOS, 2013.



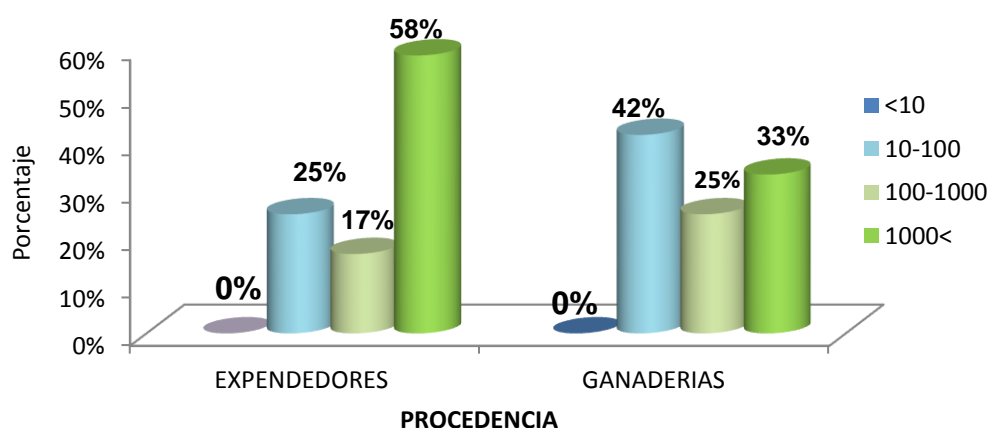
El gráfico N° 06, muestra los recuentos de:

EXPENDEDORES: de las 12 muestras analizadas, ninguna muestra (0%) obtuvo recuentos menores a 10 NMP/mL, 1 muestra (8,3%) resultó con 10-100 NMP/mL, 1 muestra (8,3%) obtuvo recuento entre 100-1000 NMP/mL y 10 muestra (83,3%) obtuvo recuentos mayores a 1000 NMP/mL.

GANADERÍAS: de las 12 muestras analizadas, ninguna muestra (0%) obtuvo recuento menor de 10 NMP/mL, 6 muestras (50%) resultó con 10-100 NMP/mL, 1 muestra (8,3%) obtuvo recuentos entre 100-1000 NMP/mL y 5 muestras de leche (41,7%) obtuvieron recuentos mayores a 1000 NMP/mL.

11.3.3. COLIFORMES FECALES

GRÁFICO N° 07
NÚMERO MAS PROBABLE DE COLIFORMES FECALES EN LECHE
CRUDA QUE SE EXPENDE EN LA CIUDAD DE IQUITOS, AÑO 2013.



El gráfico N°07, muestra los resultados de:

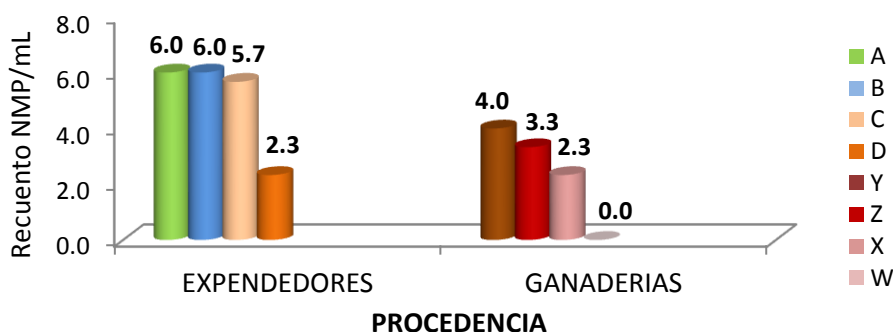
EXPENDEDORES: de las 12 muestras ninguna muestra resultó con menos de 10 NMP/mL, 3 muestras (25%) con 10-100 NMP/mL, 2(17%) con 100-1000 NMP/mL y 7 muestras (58%) con más de 1000 NMP/mL.

GANADERÍAS: de las 12 muestras ninguna resultó con recuento menor a 10 NMP/mL, 5 muestras (42%) con 10-100 NMP/mL, 3 (25%) con 100-1000 NMP/mL, 4(33%) con recuentos mayores de 1000 NMP/mL.

En esta investigación se encontró coliformes fecales en el 100% de las muestras de leche.

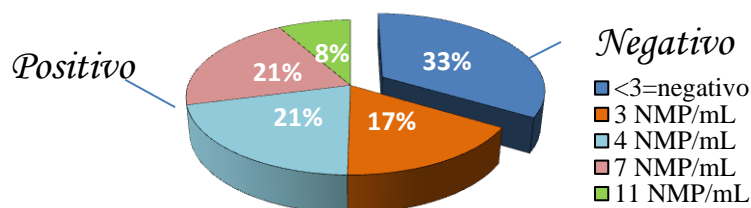
11.3.4. DETERMINACIÓN DE ESCHERICHIA COLI

GRÁFICO N°08
PROMEDIO DE ESCHERICHIA COLI EN LECHE CRUDA DE
GANADERÍAS DE LA CIUDAD DE IQUITOS, AÑO 2013.



El gráfico N°08, muestra los promedios obtenidos de los tres muestreos realizados en cada establecimiento. Donde se obtuvo que los promedios de los expendedores estuvieron entre 2.3-6.0 NMP/mL de *Escherichia coli*. De las ganaderías los promedios estuvieron entre 0-4 NMP/mL.

GRÁFICO N° 09
PORCENTAJE DE ESCHERICHIA COLI EN LECHE CRUDA QUE SE
EXPENDE EN LA CIUDAD DE IQUITOS-PERÚ, 2013.



El gráfico N° 09, muestra los porcentajes de *Escherichia coli* en la leche cruda de las 24 muestras analizadas y se encontró esta bacteria en 16 muestras (66,7%), y 8(33,3%) no se encontró.

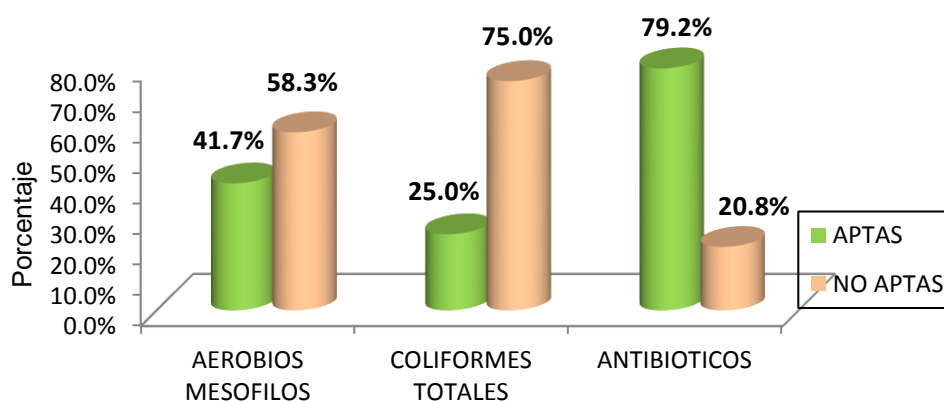
TABLA N° 10: Resultados de la investigación

Procedencia	código de muestra	Antibiótico		Recuento de aerobios mesófilos UFC/mL m=5x10 ⁵	Determinación de coliformes totales NMP/mL m=10 ²	Determinación de coliformes fecales NMP/mL	ESCHERICHIA COLI NMP/mL	Condición
		Penicilina G	Tetraciclina					
		(+)= >4 ppb	(+)= >100ppb					
Expendedores	A ₁	-	-	2,1x10 ⁵	>1100	1100	11	no apto
	A ₂	-	-	5,8X10 ⁶	>1100	1100	<3	no apto
	A ₃	-	-	4,4X10 ⁶	>1100	1100	7	no apto
	B ₁	-	-	2,0X10 ⁵	500	70	7	no apto
	B ₂	-	-	2,8X10 ⁶	>1100	210	<3	no apto
	B ₃	-	-	8,1X10 ⁶	>1100	>1100	11	no apto
	C ₁	-	-	1,4X10 ⁶	1100	500	3	no apto
	C ₂	-	+	1,4X10 ⁵	100	90	<3	no apto
	C ₃	-	-	1,9X10 ⁶	>1100	>1100	4	no apto
	D ₁	-	-	1,3X10 ⁶	>1100	>1100	7	no apto
	D ₂	-	-	6,9x10 ⁵	>1100	>1100	7	no apto
	D ₃	-	-	1,4x10 ⁶	1100	15	3	no apto
Ganaderías	W ₁	-	+	1,3X10 ⁵	500	210	<3	no apto
	W ₂	-	-	1,8X10 ⁵	90	20	<3	apto
	W ₃	-	-	1,1X10 ⁵	90	70	<3	apto
	X ₁	-	-	7,0X10 ⁵	700	500	<3	no apto
	X ₂	-	+	1,0X10 ⁵	90	70	3	no apto
	X ₃	-	-	7,5X10 ⁵	>1100	>1100	4	no apto
	Y ₁	-	-	9,7X10 ⁵	>1100	>1100	4	no apto
	Y ₂	+	-	3,0X10 ⁵	500	210	4	no apto
	Y ₃	-	+	1,2X10 ⁵	90	70	4	no apto
	Z ₁	-	-	5,5X10 ⁵	>1100	>1100	3	no apto
	Z ₂	-	-	6,9X10 ⁵	>1100	>1100	7	no apto
	Z ₃	-	-	1,4X10 ⁵	100	70	<3	apto

11.4. MUESTRAS APTAS Y NO APTAS

GRÁFICO N° 10:

MUESTRAS APTAS Y NO APTAS

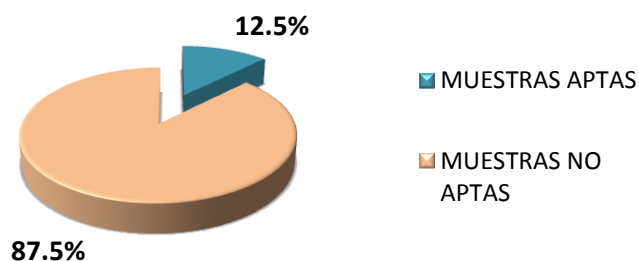


ANALISIS

El gráfico N° 10, muestra que de las 24 a aerobios mesófilos 14 (58.3%) no son aptas y 10 muestras (37.5%) aptas, a Coliformes 18 (75%) no aptos y 6(25%) aptos y a antibióticos 19 (79.2%) aptos y 5(20.8%) no aptos.

GRÁFICO N° 11:

PORCENTAJE TOTAL DE LECHE CRUDA APTAS Y NO APTAS AL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS



Según los análisis microbiológicos y de residuos de antibióticos a 24 muestras analizadas 21(87,3%) muestras resultaron no aptasy 3 (12,7%) aptas.

CAPÍTULO XIII: DISCUSIONES

Análisis de antibióticos. De las 24 muestras de leche analizadas el 20,8% resultó positivo y el 79,2% negativas. Esto concuerda con lo encontrado por Llanos (2000), en el que se obtuvo un 20,83% de positividad a residuos de antibióticos en leche que se consumía en la población de Cajamarca. Y reveló la presencia de antibióticos en la que se expende en la ciudad de Iquitos, obteniéndose el mayor número de positivos en muestras tomadas de las ganaderías, al contrario de los obtenidos de los expendedores en el que solo se detectó en una muestra, esto debido a que se pudo corroborar en las visitas exploratorias que la mayoría de las ganaderías estudiadas tienen como principal mercado a pequeñas acopiadores elaboradores y comercializadores de quesos artesanales, de comunidades de la rivera de Iquitos.

Según Pérez *et al.* (2005), la aparición de los residuos en la leche, se debe generalmente a que no se respeta los tiempos de retiro, o se estarían usando en el ganado dosis excesivas, dando como resultado la contaminación de la leche. Por lo que, la prevención de residuos en el suministro de leche debe estar a cargo de los ganaderos, utilizando adecuadamente los antibióticos, respetando los tiempos de retiro en un tiempo suficiente hasta que disminuyan los niveles o concentraciones, teniendo en cuenta lo indicado por la industria farmacéutica.⁵¹

Aunque generalmente en nuestro ámbito de estudio se sabe que la leche es tratada con calor antes de consumirla, se debe mencionar que según

Magariños (2000)⁴⁶ y Berruaga *et al.* (2007)⁴² explican que la pasteurización (60°C por 30 min) solo produce una leve inactivación del 8% sobre los antibióticos como la penicilina, y del 18-31% en las tetraciclinas; y que la ebullición inactiva el 50% de la penicilina y el 90% de la tetraciclina. Por lo tanto no eliminaría todas las concentraciones de antibióticos, y la leche positiva a estos antibióticos, a pesar que pueda ser sometida a un proceso de cocción tienen potencial riesgo para el consumidor que puede verse perjudicado en su salud. Así lo corrobora Sánchez (1995)⁴⁰, que señala que las tetraciclinas están relacionadas con problema de osificación y dentición, en niños en crecimiento. Además diferentes organizaciones internacionales como la FAO y OMS, explican que los residuos de penicilina que sobrepasan los límites permisibles (100 µg/L), pueden ser causantes de alergias inclusive conllevar a anafilaxia, sobre todo en aquellos consumidores pre sensibilizados y que sumado a estos, el consumo periódico y prolongado de residuos de tetraciclina y penicilinas pueden ser una de las principales razones de la aparición de cepas resistentes en el propio animal, sus crías y las personas, debido a que la base del desarrollo de la resistencia bacteriana está en la selección de cepas resistentes que producen ciertas concentraciones de antibiótico.⁵²

Sin embargo no necesariamente se presentaran estos problemas en todos las personas que consuman esta leche con residuos, ya que según Camean *et al.*, (2006) se debe tener en cuenta una serie de condiciones que influirá en la

aparición de alergias, como el grado de absorción de la persona, la cantidad de residuos presente en el alimento, motilidad intestinal, etc.

Como se menciona, la cantidad de antibióticos presentes en el alimento es una condición que desencadenaría algún tipo de reacción y/o problema en el organismo humano, pero al ser el kit SNAPduo, una prueba cualitativa con un límite mínimo de detección de acuerdo a lo establecido por la FDA, que es al mismo al del Codex alimentarius; no se puede determinar cuantitativamente la concentración de estos residuos que podría ser, cerca al límite permitido, o ser muy elevados. Por lo tanto las muestras positivas deben ser analizadas con un método cuantitativo más sensible como el HPLC.

Desde la parte de la normativa, se podría catalogar estos resultados positivos a penicilina G y tetraciclina como residuo ilegal, el cual se da cuando está en cantidad o proporción superior a un límite máximo permitido o autorizado, que en el caso del Perú se basa en lo establecido por el Codex Alimentarius. Según lo dispuesto en el "Reglamento de Inocuidad Agroalimentaria." Decreto Supremo N° 004-2011-AG.

Determinación de bacterias aerobias mesófilos. En el recuento de bacterias aerobias mesófilos se obtuvo que el 58,3% de las muestras resultaran no aptos. Estos recuentos resultaron muy variables en cada muestreo realizado, a excepción de una ganadería que mantuvo sus recuentos debajo del límite permitido. Esto es un indicador de que en la mayoría de los puntos de venta y producción láctea de la ciudad de Iquitos, no se tienen implementados

programas de higiene y calidad que aseguren que el producto que comercializan cumplen con los criterios microbiológicos para mesófilos aerobios.

Según Jay, JM. (2002), los microorganismos que se encuentran en la leche, se hallan inicialmente presentes en la ubre, en la piel de la vaca, y las existentes en los utensilios o líneas de ordeños; estas elevan considerablemente el recuento si es que la limpieza y desinfección no son realizadas minuciosamente como se observó en las muestras tomadas de los expendedores. Hay que señalar que una leche recién ordeñada (de vaca sana) solo tiene una contaminación que puede valorarse entre 300 y 1500 bacterias por mililitro, y es a partir de la ordeña cuando aumenta el recuento microbiano y estos no se desarrollan durante las primeras horas que siguen al ordeño, pues la leche fresca tiene un cierto “poder bacteriostático” que inhibe el desarrollo en ese lapso, dependiendo, de la temperatura.

Se determinó que los recuentos más bajos de aerobios mesófilos se dieron en las ganaderías, con promedios que fueron entre 5.2-5.7 (\log_{10}); esto puede ser debido a que la recolección de las muestras fue realizada en las primeras horas post ordeña a diferencia de los promedios obtenidos de los expendios que fueron de entre 5.9-6.2 (\log_{10}), en el que se debió realizar a horas de la tarde, horario en la que la leche es comercializada.

Además, del tiempo post ordeña los resultados evidenciaron que la temperatura de almacenamiento fue uno de los factores del alto recuento

obtenido, debido, según Jay, JM. (2002) , a la relación que existe entre el tiempo y la temperatura de almacenamiento, sobre el crecimiento de las bacterias, que a 36.1-37.7°C, temperaturas comunes del clima tropical de la ciudad de Iquitos, las bacterias se reproducirían cada 20 minutos y, al contrario mantenidas a temperaturas de refrigeración menores de 7.2-0°C en la que debe ser conservada la leche, la multiplicación cesa. Esto evidencia una deficiencia en la refrigeración post ordeña, en el transporte y almacenamiento de la leche, hasta su comercialización.²³

Calderón, A. *et al.*, (2006). Dice que para disminuir estos valores en los recuentos, se deben fomentar las buenas prácticas ganaderas, como la implementación del presellado con productos recomendados para este fin, tiempo adecuado del presellado, secado de los pezones con papel desechable, uso de guantes de látex recomendados para el ordeño, y las prácticas higiénicas que garantizan pezones limpios, secos muy sanos, que es la primera norma para obtener leche de excelente calidad bacteriológica, siempre cuidando que el agua utilizada para la limpieza de los equipos, utensilios de ordeño, la higiene del animal y del personal, deben sean aplicados constantemente.⁵³

Determinación de coliformes. En los recuentos de bacterias coliformes totales, se obtuvo como resultado que el 75% resultaron no aptas, de los cuales el 58,3% fueron obtenidos de las ganaderías y 91,6% de los expendedores. Los recuentos obtenidos de los expendedores fueron más altos evidenciando que

estas bacterias presentes comúnmente en la microflora de la leche encontraron condiciones favorables de multiplicación, excediendo por mucho los límites que la normativa exige para la vigilancia sanitaria.

Según Calderón, A. *et al.* (2006), la presencia de Coliformes totales en la leche explica una inadecuada manipulación e higiene de la leche, indicativo de una muy probable contaminación de origen fecal, convirtiéndose en un evaluador del grado de limpieza de las manos de los operarios, de la limpieza y desinfección de utensilios.⁵³

Estas bacterias son sensibles al calor y son eliminadas con la pasteurización, excepto las bacterias esporuladas y las termodúricas, estas son capaces de sobrevivir a la pasteurización por lo que son un peligro. El agua sería una fuente importante de microorganismos psicrófilos y de bacterias coliformes por contaminación con heces.⁵²

En las leches crudas no se pueden encontrar más de 1000 coliformes/mL, la legislación americana reconoce como norma 750 UFC/mL y se establece que la leche considerada como ideal debe contener menos de 50 UFC/mL. Los criterios para el caso de la vigilancia sanitaria es más rigurosa 100 NMP/mL, sin embargo los valores encontrados en este estudio estuvieron por encima de los anteriores.

Al determinar la contaminación por coliformes fecales se encontró en las 24 muestras (100%), recuentos mayores de 1000 NMP/mL en el 54% de las muestras. Se pudo observar que los recuentos resultaron elevados, evidencia

de que ha sido contaminado con materia fecal, ya sea proveniente de la deficiente higiene realizada en el momento anterior al ordeño, pues según explica la Organización Privada de Desarrollo, (2010) la causa de la contaminación de los cuartos mamarios con bacterias de este grupo se debe a que los bovinos suelen recostarse en el pasto junto a su propio estiércol, llegando a contaminar la leche sino se realizó antes el lavado de las ubres al momento de la ordeña. La deficiente higiene del ordeñador, también es causante de la contaminación fecal, sino sigue los pasos de las buenas prácticas de ordeña, y también sugiere un riesgo indirecto de adquisición de otras bacterias patógenas que se transmiten mediante dicha vía.

Es posible que la recontaminación, dado en la manipulación por parte de los comercializadores haya sido un factor del elevado recuento de coliformes fecales.

La determinación de *Escherichia coli*. La aislación y recuento de la cepa de *Escherichia coli* típico, dio que el 66,7% de la leche tenía entre 3-11 NMP/mL. y el 33.3% resultaron negativos a esta bacteria, que tiene como hábitat natural el tracto intestinal del hombre y animales, y es igual indicador de contaminación fecal, además es el indicador clásico de la posible presencia de patógenos entéricos en los productos lácteos y en otros alimentos crudos.

Según la Organización Privada de Desarrollo (2010), en nuestro medio, es frecuente observar cómo el personal encargado del ordeño no se lava las manos y peor aún si las humedece con la misma leche para lograr lubricación que facilite el ordeño. Por lo que se ha señalado al ordeñador como

responsable de la contaminación de la leche con microorganismos patógenos (*S. Aureus*, *Leptospiras*, *E. coli*, *M. tuberculosis*, *Streptococcus*, etc.). Las heridas infectadas en manos y brazos pueden ser fuentes de algunos de estos microorganismos.

Según la Norma técnica peruana sobre buenas practica de ordeño (NTP 202.200.2007), el personal de ordeño debe estar en buen estado de salud, poseer un certificado médico que reconozca su aptitud para manipular alimentos, deberá siempre antes de iniciar las operaciones de ordeño o manipulación de la leche lavarse y desinfectarse las manos y antebrazos, usar la ropa adecuada durante el ordeño, la cual debe estar limpia al inicio de cada período de ordeño.⁵⁴

Muestras aptas y no aptas. Al comparar los resultados de los análisis realizados a cada muestra, con los criterios, dio que el 87,5% (21 muestras) resultaron no aptas y 12,5% (3 muestras) resultaron aptas. Indicativo de que se debe tener un mayor control en la producción de la leche. Siendo la causa mayoritaria para este alto porcentaje de muestras no aptas, a los recuentos elevados de bacterias del grupo coliformes que en la mayoría de los casos tanto en ganaderías y expendios evidencio un déficit en la calidad sanitaria e higiénica.

CAPÍTULO XIV: CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio de investigación, llegamos a las siguientes conclusiones:

1. En relación a la encuesta sobre el uso de antibióticos en las ganaderías de producción de leche de la ciudad de Iquitos, se logró determinar que los medicamentos más utilizados por los ganaderos son los antibióticos del grupo betalactámicos.
2. La detección de residuos de antibióticos en leche cruda, dio como resultado muestras positivas a residuos de penicilina G en 8.3%, y tetraciclina en 12.5% alcanzando un porcentaje de 20,8% de positividad a ambos antibióticos. Un porcentaje alto para la importancia que tiene en la salud humana. Según la procedencia de las muestras, se obtuvo que de las ganaderías se detectó el 16,6% positiva a antibióticos y de los lugares de expendio resultaron positivas el 4,2%.
3. La contaminación encontrada en la leche que se expende diariamente en la ciudad de Iquitos, no responde a una de las condiciones del Reglamento Sanitario de Alimentos, en donde dice que la leche no deberá contener sustancias antibióticos en concentraciones mayores a lo estipulado por el Codex Alimentarius.
4. La determinación de la carga microbiológica, dio que en el análisis de aerobios mesófilos de la leche; el 58,3% de las muestras no son aptas, con

recuentos muy superiores a la exigida por la norma microbiológica del Minsa/Digesa.

5. Del análisis de coliformes totales, 75% resultaron no aptas un porcentaje muy alto indicador de deficiencias en el manejo higiénico de la leche. Además se encontraron coliformes fecales en el 100% de las muestras, y *Escherichia coli* en el 66,7%, por lo que se comprobó contaminación de origen fecal.
6. A través de los análisis de la investigación se concluye que aproximadamente el 87,5% no aptas y 12,5% de las muestras analizadas son aptas a los análisis de antibióticos y carga microbiana. Por lo que se evidenció una deficiencia en el manejo higiénico-sanitario de la leche cruda, que se comercializó entre los meses de esta investigación.
7. Con los resultados obtenidos se puede concluir que, a pesar de que no se aislaron microorganismos patógenos, las muestras evaluadas presentan altas concentraciones de microorganismos indicadores, por lo que la presencia de patógenos es factible, representando un riesgo para la salud pública. Además, estas altas concentraciones de microorganismos también propician un deterioro acelerado del producto por lo que es necesario mejorar la calidad integral de la leche, incluyendo algún tipo de proceso de higienización, con el fin de ofrecer un producto seguro a la población y una buena materia prima para la elaboración de productos lácteos como los quesos frescos, mantequilla etc.

CAPÍTULO XV: RECOMENDACIONES

En base a los hallazgos obtenidos del presente estudio de investigación, es necesario recomendar los siguientes:

1. Las industrias lácteas de la ciudad de Iquitos deben implementar sistemas de aseguramiento de la calidad, en los dos momentos de la cadena agroindustrial tales como: (BPP) buenas prácticas pecuarias, (BPM) buenas prácticas de manufactura, (POES) procedimientos operativos estandarizados de saneamiento y/o (HACCP) análisis de peligros y puntos críticos de control, para garantizar la inocuidad.
2. Se recomienda que las ganaderías productoras de leche organice frecuentemente cursos de capacitación para las personas que intervienen en el proceso de producción lechera (profesionales, técnicos, ganaderos u otros sobre la importancia del cumplimiento de las (BPA) buenas prácticas agrícolas, de las (BPV) buenas prácticas veterinarias, respetando el periodo de espera para la eliminación del antibiótico en las vacas tratadas.
3. Difundir la utilización de la prueba SNAPduo Beta-Tetra St, para la determinación de residuos de antibióticos, el control periódico de incidencia de enfermedades por sectores ganaderos, con el fin de sugerir la utilización de antibióticos específicos y evitar el uso indiscriminado de los mismos.

4. El Ministerio de Agricultura por medio del departamento de sanidad animal debe establecer un programa, a mediano y largo plazo, que permita el expendio exclusivo de la leche realmente pasteurizada e inocua a la población, realizando un control sanitario estricto y severo de la leche, condenándose aquella que resulte contaminada microbiológicamente y con residuos de antibióticos, por atentar contra la salud pública.
5. Realizar investigaciones similares para poder cuantificar e identificar individualmente los residuos de antibióticos en alimentos de origen animal consumidos por la población de Iquitos, con métodos más sensibles como el de cromatografía líquida de alta resolución (HPCL) para poder cuantificar la cantidad de residuos que el consumidor ingiere.
6. Mejorar el manejo del ordeño, sanitización y salud del ganado lechero estableciendo instalaciones adecuadas para el ordeño que faciliten su higiene y limpieza además de mantener la cadena de frío en la leche, posterior al ordeño.
7. Hacer uso racional de los antibióticos en los tratamientos que se apliquen a vacas en producción, cumpliendo con el periodo de retiro, ya que el irrespeto de éste probablemente cause que exista residuos de antibióticos en leche. A los ganaderos, utilizar únicamente antibióticos que estén contemplados en el registro oficial de nuestro país.

CAPÍTULO XVI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization (2005). Working principles for risk analysis for application in the framework of the Codex Alimentarius. Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual. (15^a Ed.), Roma: Editores.
2. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2006). Trade forms and food security. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Ed.), Roma: Editor.
3. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2008) Expert Meeting on Climate-Related Transboundary Pests and Diseases Including Relevant Aquatic Species, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Options for Decision Makers. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (Ed.), Roma: Editor.
4. Organización Mundial de la Salud (2006). Evaluation of Certain Food Contaminants. 64^a Report of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives. (WHO Technical Report Series 930). Geneva: Editor.
5. Jawetz, L., Melnick, J., & Adelberg, S. (1992). Microbiología Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg, (14^a Ed). México: El Manual Moderno.
6. Sánchez, G. (1995). Residuos de fármacos antimicrobianos en alimentos de origen animal. Problemática general. Revista ACOVEZ. 20(3): 26-29.

7. Jacquet, J., & Auxepaules, M. (1978). Le problème de la pollution du lait par les antibiotiques. État actuel de la question. Francia:
8. Oda, T., & Hiwaki, H. (1996). Heat stability of 24 antibiotics in food extracts. Japan: FoodHyg Soc.
9. Reglamento del Decreto Legislativo N° 1062. Ley de inocuidad de los alimentos DS N° 034-2008 AG. Lima.
10. Arias, M., Antillón, F. & Cubillo, Z. (1988). Residuos de penicilina en leche bovina en Costa Rica. *Revista. Costarricense. Ciencia. Médica.*, 9(2):125-129
11. Barrera, A. M., & Ortez, E. M. (2012). Determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en leche cruda de cinco ganaderías ubicadas en el municipio de San Luis Talpa y en leche pasteurizada. Tesis para optar al título de licenciado en Medicina Veterinaria, escuela de Medicina Veterinaria, Universidad del Salvador, El Salvador.
12. Llanos, G. (2002). Determinación de residuos de antibióticos en leche fresca que consume la población de Cajamarca. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 2(2): 35-43.
13. Guerrero, D. M., Mofa, R., Gamarra, G., Benavides, E. R., Roque, M., & Salazar, M. E. (2009). Detección de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en leche cruda comercializada en el Callao. *Revista Ciencia e Investigación*, 12(2): 79-82.

14. Reyna, G. E. (2009). Detección de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en leche comercializada en el mercado del Callao. En: J, Merino (Ed.), Revista Ciencia y Tecnología. 12 (1): 25-31. Callao: Editorial Universitaria.
15. Traverso, E. E. Control bacteriológico de la leche de Iquitos (1983). Tesis para optar el título de Biólogo, Escuela de Biología. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Iquitos, Perú.
16. Norma Técnica Peruana NTP 202.001:2003. Leche y productos lácteos. especificaciones y clasificación.
17. Perú. Ministerio de Agricultura, Dirección de Crianzas, Dirección General de Promoción Agraria (2005). Aspectos Nutricionales y Tecnológicos de la Leche. Lima. Autor.
18. Fenema, O. R. (1982). Introducción a la ciencia de los alimentos. (1ª ed.), Ed. Reverté S.A.
19. Cabrera, M. y Col. (2003). Cómo obtener leche de buena calidad. Recuperado el 24 de Agosto del 2013. de: <http://www.turipana.org.co/leche.htm> - 52k.
20. Cotrino, V., & Gaviria, B. (2003). Manejo integrado de plagas y enfermedades en explotaciones ganaderas. Mastitis y calidad de la leche. Recuperado el 23 de Noviembre del 2013, de: <http://www.fedegan.org.co/81manejoIntegrado.html> - 55k.
21. Organización Privada de Desarrollo. (2010). Tecnología en lácteos: Calidad de la leche. Lima: Solid OPD.

22. Robinson, R. K. (1987). *Microbiología lactológica*. Zaragoza: Acribia S.A.
23. Jay, J. M. (2002). *Microbiología moderna de los alimentos*. (4ª Ed.), Zaragoza: Acribia S.A.
24. Potter, W. G. (1989). *Leche y productos lácteos*. Zaragoza: Acribia S.A.
25. Alais, J. (1999). *Microbiología de la leche y los productos lácteos*. Zaragoza: Acribia S.A.
26. Pascual A. 1998
27. Comité Internacional de Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos (2000). *Microorganismos de los alimentos, su significado y métodos de enumeración*. (2ª Ed.) Zaragoza: Acribia S. A
28. Cameán, M.A., & Reppeto, M. (2006). *Toxicología alimentaria*. España: Diaz de Santos.
29. Organización Mundial de la Salud. (1962). *Problemas de Salud Publica Relacionados con el uso de Antibióticos en los alimentos y Piensos*. (Informe de un grupo científico de la OMS. Serie de informes técnicos: 260), Ginebra: Organización mundial de la salud.
30. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo: Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Ed.) (Estudio: 162), Roma: Editor.
31. Azañero, G. P., & Chiroque, M. A. (2010). *Detección y cuantificación de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados*

de Lima Cercado. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Escuela Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

32. Anadón, A. (2007). Antibióticos de uso veterinario y su relación con la seguridad alimentaria y salud pública. España: *Racve.es*; recuperado: 10 de julio de 2013]. de: <http://www.racve.es>.
33. San Martín BN, Yatabe R T, Gallardo L. Medina HP. Manual de buenas prácticas en el uso de antibióticos y antiparasitarios en la salmonicultura chilena. Santiago, Chile: Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA), Ministerio de Economía, Fomento y Turismo; 2010.
34. Brouillet, P. (1992). Les residues inhibiteurs dans le laitvache a la production. *Revista GTV*. 92-4.
35. Parra, M. H., Peláez, L., Londoño, J. E., Pérez. N., & Rengifo, G. (2003). Los residuos medicamentosos en la leche: Problemática y estrategias para su control. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria. Neiva: El Poirá S.A.
36. Protocolos de Tratamiento elaborados por la comisión clínica de profilaxis y terapéutica antibiótica, Ed. Instituto Nacional de Saude Hospital Juan Canalejo, A coruña. 1990.
37. Instituto Lactológico de Lekunberri (2004). El empleo responsable de medicamentos en explotaciones ganaderas. Legislación, Riesgos y

- Métodos analíticos, Sevilla: Autor Amiot, J. (1991). Ciencia y tecnología de la leche. Zaragoza: Acribia S.A. p. 1-47.
38. Servicio Nacional de Sanidad Animal (2010). Manual de campo para el reconocimiento y atención de enfermedades del rebaño. Lima: Ministerio de Agricultura, Dirección de Sanidad Animal.
 39. Organización Mundial de la Salud. (2002). Evaluation of contain veterinary drug residues in Food. Fifty eighth report of the joint FAO/WHO expert commite on food additives WHO (Technical report series: 911). Geneva: Organización Mundial de la Salud.
 40. Sánchez, G. (1995). Residuos de fármacos antimicrobianos en alimentos de origen animal. Problemática general. Revista ACOVEZ. 20(3): 26-29.
 41. Calvino, L. s. f. (2003). Cómo producir leche sana? Contaminantes en leche. Recuperado el 12 octubre del 2013. de: <http://www.cuencarural.com.ar/lecheria/le0013.htm> - 80k.
 42. Berruaga, I., Zorraquino, M. A., Beltran, M. C., Althaus, R. L., & Molina, M. P. (2007). Efecto del calentamiento sobre la actividad antimicrobiana de betalactámicos y tetraciclinas en leche. Italia. Mundo Lácteo y Cárnico.
 43. Botero, J. (1997). Estrategias para el control de fármacos y otros residuos en leche. En: Seminario Residuos químicos en alimentos: implicaciones en salud pública y comercio internacional. Revista ACOVEZ.
 44. Magariños, H. (2000). Producción higiénica de la leche cruda. Colombia: Valdivia, CL, Producción y servicios Incorporados

45. Pérez, J. (2005). Ensayos de familiarización en la técnica de detección de residuos de antibióticos y sulfamidas en músculo esquelético animal por el método de las cuatro placas (tesina): Buenos Aires: Universidad de Belgrano
46. www.snapduo.com
47. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos para la vigilancia sanitaria de alimentos y bebidas de consumo humano (2008). NTS N° 071. Minsa/Digesa V°01.
48. Codex Alimentarius, (2011). Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. Roma, FAO-OMS.
Recuperado el 8 noviembre del 2013 de:
http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_s_2011.pdf
49. International Dairy Federation (1985). IDF Standard 50B. Milk and Milk Products. Methods of sampling. Suecia: Autor.
50. Ministerio de salud & Dirección de Gestión Ambiental (2001). Manual de análisis microbiológico de alimentos. Lima: Editores.
51. Pérez, A., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Díaz, G., Monroy, C., & Coronado, M. (2005). Residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas organofosforados en leche y derivados. Carnilac 70: 2-3.
52. WHO, 2008. Sánchez G. Residuos de fármacos antimicrobianos en alimentos de origen animal. Problemática general. Revista ACOVEZ. 1995. Vol. 20. N° 3: 26-29.

53. Calderón, A., García, F., & Martínez, G. (2006). Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Revista Mvz Córdoba*. 11 (1): 725-737.
54. Norma Técnica Peruana. Leche y productos lácteos. Buenas prácticas de Ordeño. NTP 202.200.2007

CAPÍTULO XVII: ANEXOS

ANEXO N° 01

ENCUESTA REALIZADA A PRODUCTORES PECUARIOS SOBRE
MANEJO DE GANADO BOVINO Y PRODUCCIÓN LÁCTEA

UNIVERSIDAD DE LA AMAZONIA PERUANA
FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



Nombre y ubicación de la de la explotación:
.....

Nombre del encargado:
.....

SALUD ANIMAL

1) ¿Cuál es el plan profiláctico que se emplea en la explotación?
.....

2) ¿Cuales son las enfermedades que se presentan más comúnmente? (terneros, vacas en producción, etc.)
.....

3) ¿Cuales son los tratamientos que se efectúan para controlar estas enfermedades? (antibióticos)
.....

4) ¿Tiene asistencia de un médico veterinario? ¿Cuáles son sus labores?
.....

MANEJO DEL HATO

5) ¿Qué tipo de pasto o alimentación se ofrece al ganado?
.....

6) ¿El ordeño es manual o mecánico?
.....

7) ¿Cuántos ordeños se realizan al día
.....

CARACTERISTICAS DEL GANADO

8) ¿Cuál es el número total de animales del hato?
.....

9) ¿Cuántas vacas están en producción?
.....



10) ¿Quiénes son los compradores de la leche?
.....

11) ¿Cuánta leche venden? Y ¿cada cuánto?

Gracias por su amabilidad

ANEXO N° 02

CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE LOS KITS SNAPDUO BETA-TETRA

		
CERTIFICATE OF ANALYSIS		
Certificado de Análisis / Certificat de contrôle / Chargen-Prüfprotokoll		
SNAP® duo Beta-Tetra ST		
Product code: 99-27420	Lot number: EJ078	Expiration date: 14 May 2014
Final Release Results:		
Residue in Sample	Pass/Fail	
Negative	Pass	
Tetracycline 100 ppb	Pass	
Penicillin G 4 ppb	Pass	
Please contact IDEXX Technical Support at 1-207-556-4696 or email FEDtechnicalservice@idexx.com with questions.		
This information is released by:		
Name: <i>Paula Guerratto, Quality Assurance Auditor I</i>		
Signature: 		
<small>PRM-GA-80_A, CO #34535, Effective Date: 06/22/07</small>	Thursday, August 29, 2013	
<small>IDEXX Laboratories, Inc. - One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092, USA - Tel.: +1-207-856-0100</small>		

ANEXO N° 03

LÍMITES MÁXIMOS PERMITIDOS PARA ANTIBIÓTICOS EN LECHE.

Límites máximos de residuos para Bencilpenicilina/Bencilpenicilina procainica				
Especie	Tejido	LMR	Año de adopción	Nota
Vacuno/Vaca	Leche	4 µg/l	1999	

Límites máximos de residuos para Clortetraciclina/Oxitetraciclina/Tetraciclina				
Especie	Tejido	LMR	Año de adopción	Nota
Vacuno/Vaca	Leche	100 µg/l	2003	

Fuente: Codex Alimentarius, 2011

ANEXO N° 04

NORMA SANITARIA DE CALIDAD E INOCUIDAD PARA LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO. NTS N° 071 MINSA/DIGESA.V.01. ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA LECHE

NTS N° - MINSA/DIGESA-V.01 NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO						
6.2. Criterios microbiológicos						
Los alimentos y bebidas deben cumplir íntegramente con la totalidad de los criterios microbiológicos correspondientes a su grupo o subgrupo para ser considerados aptos para el consumo humano:						
I. LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS.						
I.1 Leche cruda destinada sólo al uso de la industria láctea.						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por mL	
					m	M
Aerobios mesófilos	3	3	5	1	5×10^5	10^6
Coliformes	4	3	5	3	10^2	10^3

ANEXO N° 05

NÚMERO DE UNIDADES DE TOMA DE MUESTRA PARA LA VIGILANCIA SANITARIA. (NTS N° 071 MINS/DIGESA -V.01)

- 5.5. Excepciones en que "n" es diferente de 5
- a) **Número de unidades de muestra para Registro Sanitario de alimentos y bebidas.**
El número de unidades de muestra de alimentos y bebidas (n) para la inscripción en el Registro Sanitario podrá ser igual a uno (n=1) y deberá ser calificada con los límites más exigentes (m) indicados en la presente disposición para ese tipo de alimento o bebida.

ANEXO N° 06

TABLA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE.

Tabla del Número Más Probable (NMP) por gramo o mililitro utilizando tres series de tres tubos cada una, conteniendo 10 ml de medio líquido y sembrando 1 ml de la dilución 1:10, 1 ml de la dilución 1:100 y 1 ml de la dilución 1:1.000

<i>Tres tubos 1 ml 1:10</i>	<i>Tres tubos 1 ml 1:100</i>	<i>Tres tubos 1 ml 1:1.000</i>	<i>NMP de gérmenes g o ml</i>
0	0	0	<3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	480
3	3	2	1.100
3	3	3	>2.400

ANEXO N°07

TABLA PARA DIFERENCIACIÓN DE COLIFORMES

	<i>Prueba del indol</i>	<i>Prueba del rojo de metilo</i>	<i>Prueba de Voges Proskauer</i>	<i>Crecimiento en citrato.</i>
<i>Escherichia coli</i>				
Tipo I (típico)	+	+	-	-
Tipo II	-	-	-	-
intermedios				
Tipo I	-	-	-	+
Tipo II	-	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>				
Tipo I	-	-	-	+
Tipo II	-	+	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>				
Irregulares	-	-	-	+
Tipo I	-	+	+	-
Tipo II	+	-	+	-
Tipo VI	-	-	-	+
Irregulares, otros tipos	Reacciones variables			

Fuente: Adaptado de ICMSF, 2000

ANEXO N° 08

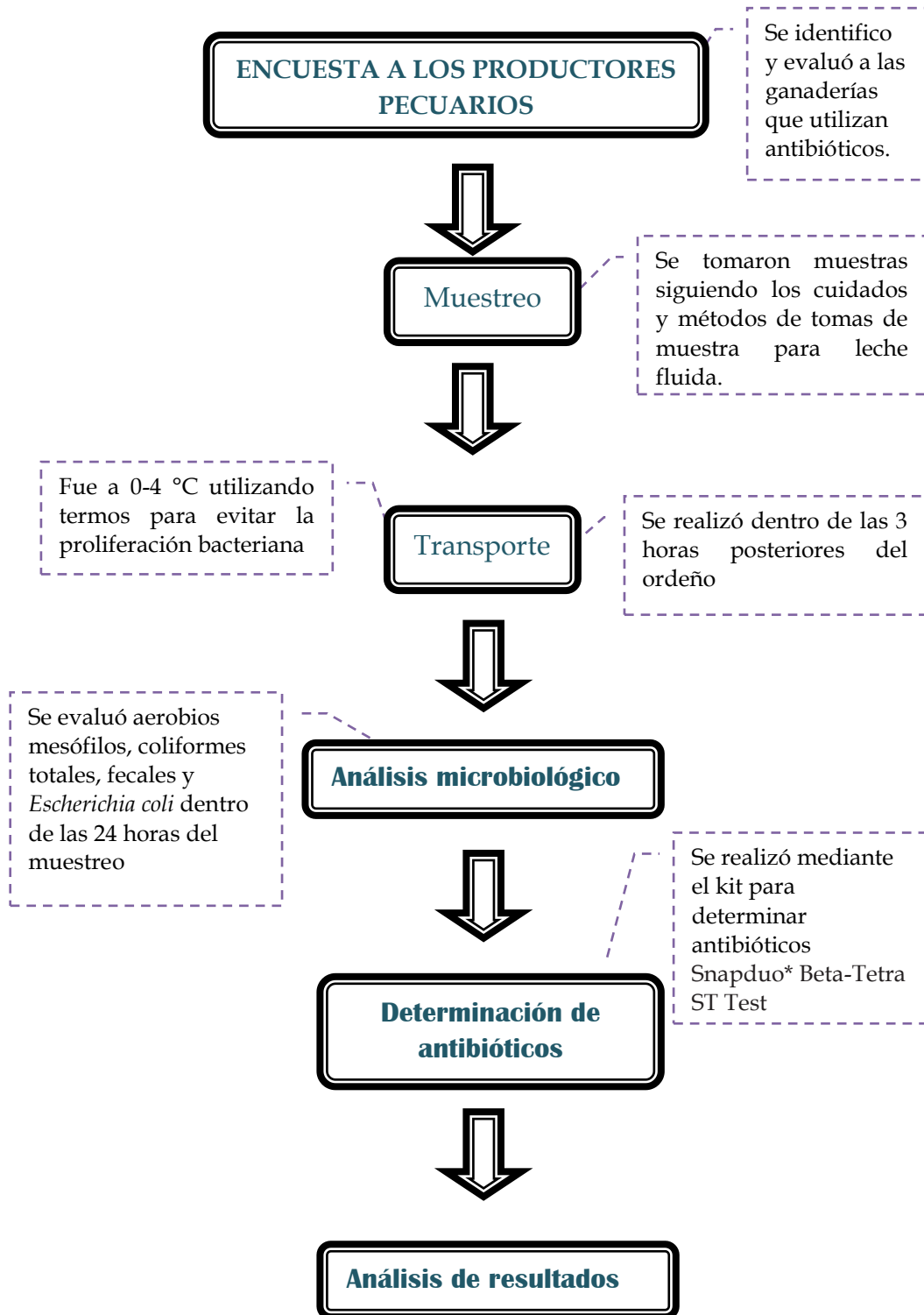
**VALORES DE RECUENTO ESTANDAR EN PLACA TRASFORMADOS A
LOGARITMO BASE 10**

Muestreo	GANADERÍAS				NTS N° 071 Minsa/Digesa
	W	X	Y	Z	
1	5.11	5.85	5.99	5.74	5.7
2	5.26	5.00	5.48	5.84	5.7
3	5.04	5.88	5.08	5.15	5.7
media	5.14	5.57	5.51	5.58	5.7
des.estandar	0.109	0.497	0.455	0.375	
coefi de varia(%)	2.12	8.91	8.25	6.72	

Muestreo	EXPENDIOS				NTS N° 071 Minsa/Digesa
	A	B	C	D	
1	5.32	5.30	6.15	6.11	5.7
2	6.76	6.45	5.15	5.84	5.7
3	6.64	6.91	6.28	6.15	5.7
media	6.24	6.22	5.86	6.03	5.7
des.estandar	0.800	0.828	0.619	0.169	
coefi de varia(%)	12.81	13.31	10.57	2.80	

ANEXO N° 09

FLUJOGRAMA DE LA INVESTIGACION



ANEXO N° 10

DIAGRAMA N° 01. RECUENTO ESTANDAR EN PLACA

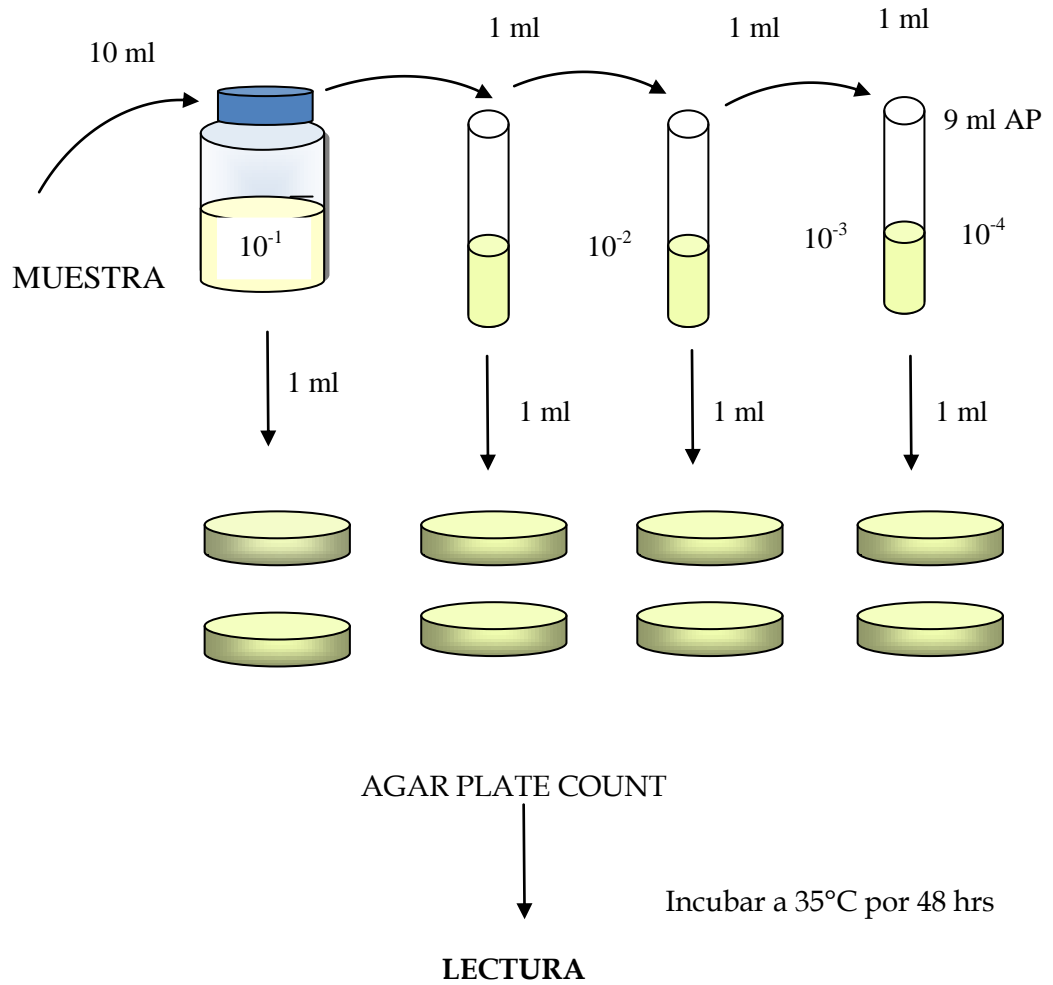
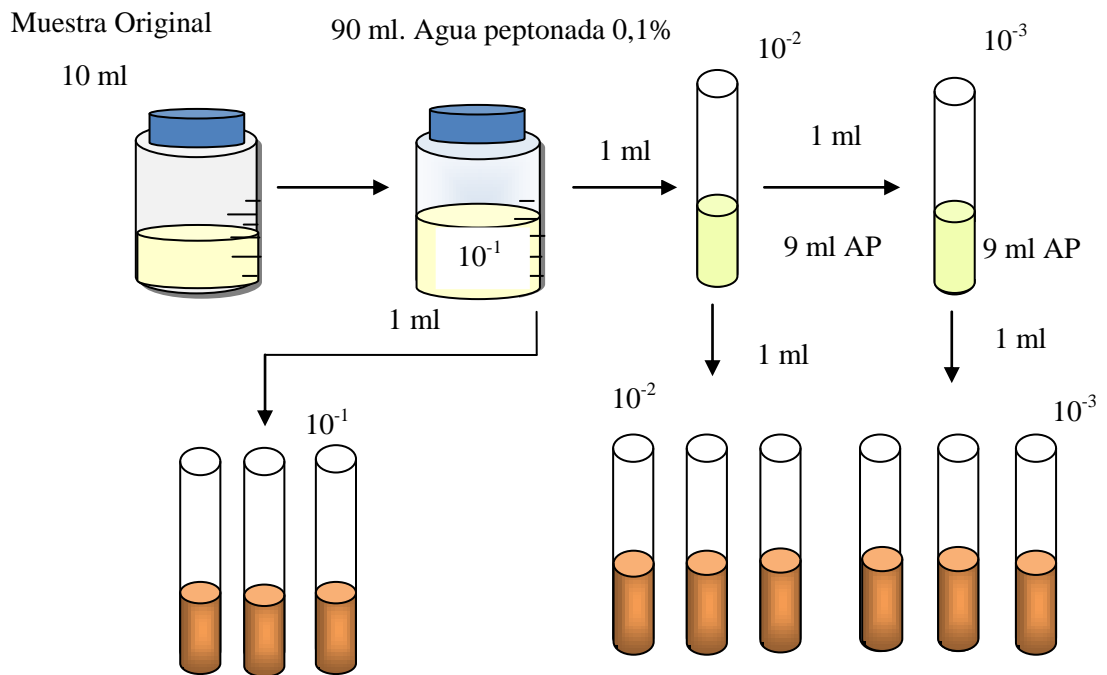


DIAGRAMA N° 02. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES POR LA TECNICA DE LOS TUBOS MULTIPLES DEFERMENTACION (NMP).



9 ml. Concentración normal Caldo Lauril Sulfato

Se incubó a 37°C 24 - 48 hrs.

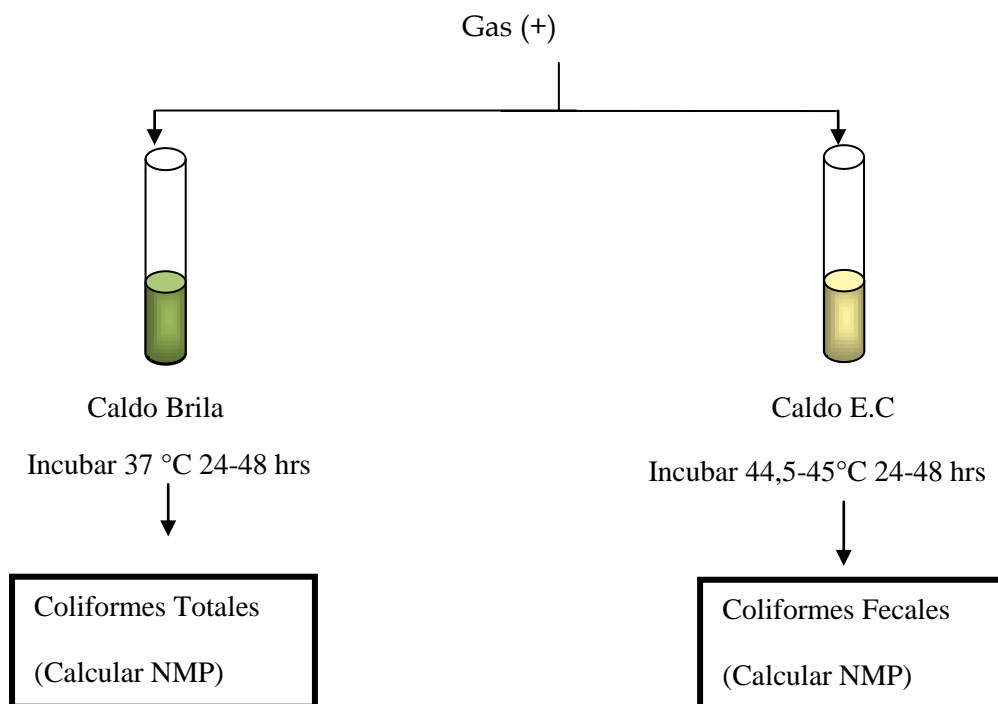
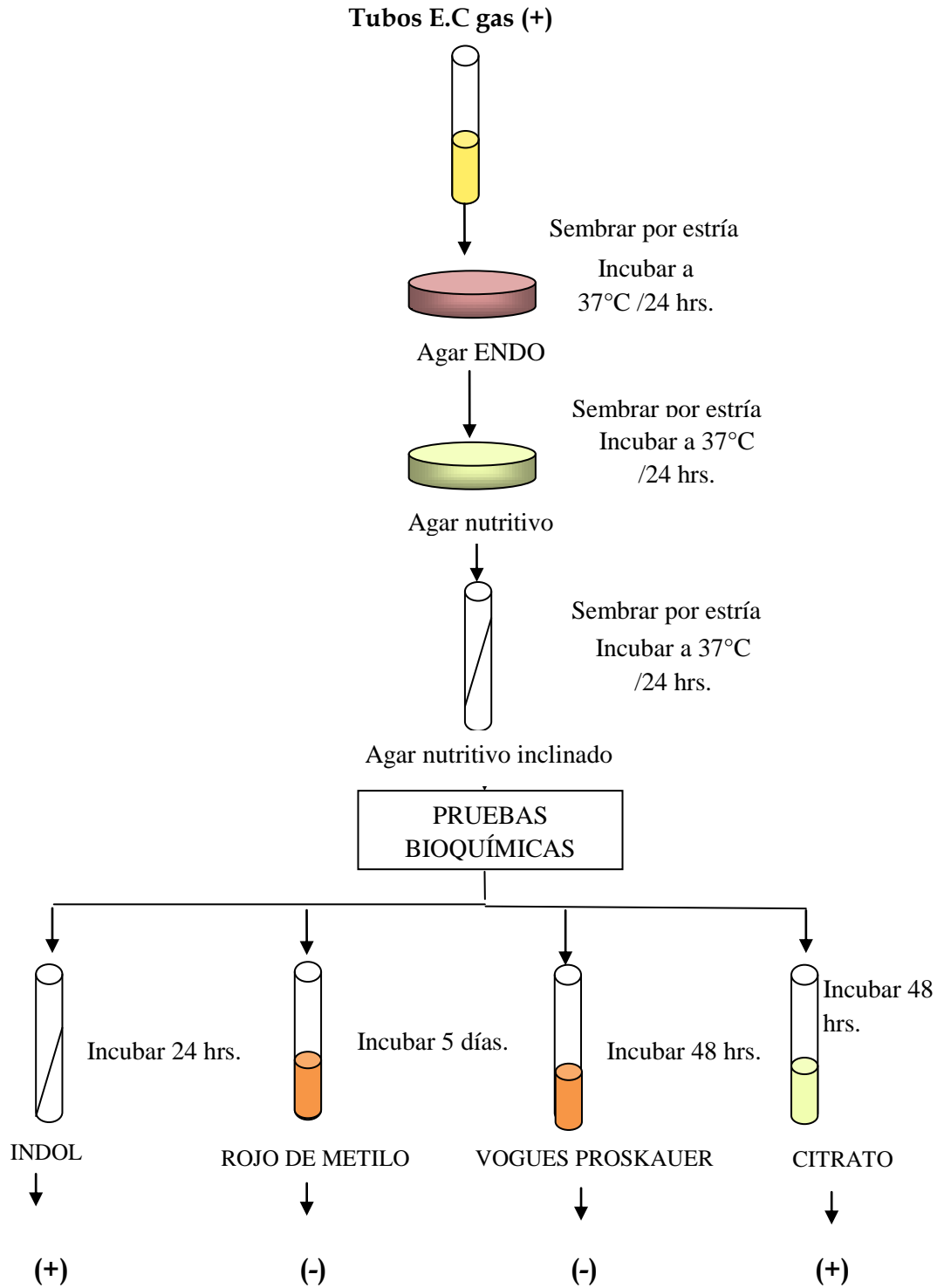


DIAGRAMA N° 03.

DETERMINACIÓN DE ESCHERICHIA COLI



CAPÍTULO XVIII: FOTOS

18.1. PROCEDIMIENTO DE LA RECOLECCIÓN DE LA INFORMACION

I. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

MATERIALES Y CRISTALERIA ESTERIL



FOTO N° 04: Material de vidrio esteril para la determinación de bacterias mesófilos aerobios, coliformes totales, coliformes fecales y *Echerichia coli*.

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO



FOTO N° 05: Preparación de medios de cultivos. Agar Plate Count (Recuento estándar en placa) fue atemperado en baño María a 44-45°C antes de agregarlos a las placas petri.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Aerobios mesófilos y coliformes



FOTO N° 06: Preparación del inóculo. Inoculación de las placas petri y tubos con una pipeta estéril 10 mL de muestra y se transfiere al frasco conteniendo 90mL de AP 0,1% para preparar la dilución 10^{-1} .



FOTO N° 07: Homogenización los tubos conteniendo 9mL. de AP y un 1mL de muestra por 20 segundos en el aparato vortex.

INOCULACIÓN DE LAS PLACAS Y TUBOS

Aerobios mesófilos



FOTO N° 08: Inoculación de las placas. Se tomaron 1 mL del inóculo de las diluciones seriadas y se inocula a las placas petri estériles.

Coliformes totales



FOTO N° 09: De los tubos positivos de caldo Lauril sulfato a 24 y 48 hrs. se siembran con un asa de aro en caldo lactosado 2% verde brillante para la confirmación de coliformes totales.

Coliformes fecales



FOTO N° 10: De los tubos positivos de caldo Lauril sulfato a 24 y 48 hrs. se siembra a caldo EC Broth.

LECTURA DE LOS RESULTADOS

Aerobios mesófilos

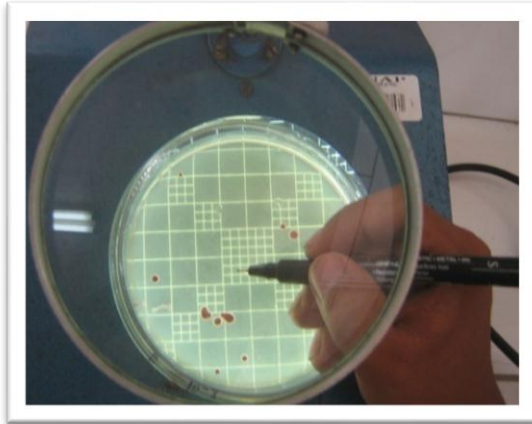


FOTO N° 11: Lectura de resultados Colonias de color rojo teñidas por TCC y recuento estándar en placa con contador de fondo oscuro.

Coliformes totales y fecales

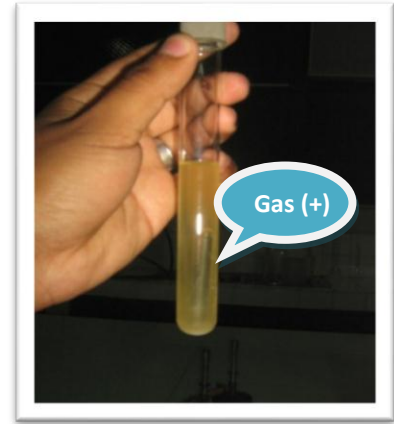


FOTO N° 12: Tubo de caldo EC gas positivo

DETERMINACIÓN DE ECHERICHIA COLI

Aislamiento y purificación de cultivos

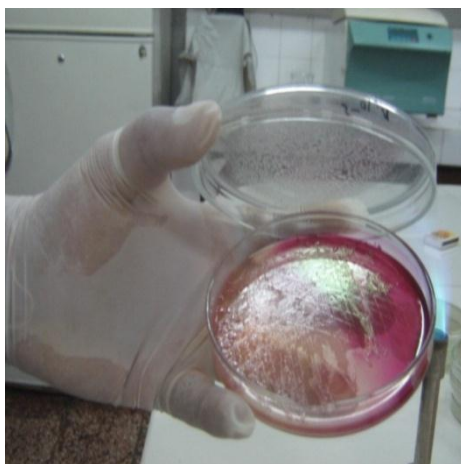


FOTO N° 13: Aislamiento de cultivos. Se siembra por estría en agar ENDO con asa de aro se incuba 24 hr a 37 °C y se traspasa por estría a agar nutritivo y se incubó por 24 hr a 37°C.



FOTO N° 14: Tubos de agar nutritivo inclinado con cultivos puros.

LECTURA DE RESULTADOS PRUEBAS BIOQUIMICAS

Reacciones positivas y negativas de pruebas IMViC



FOTO N° 15: Prueba del indol
sódico



FOTO N° 16: Prueba del citrato



FOTO N° 17: Prueba de Vogues Proskauer

II. ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS

DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS



FOTO N° 18: Kit SNAPduo



FOTO N° 19: Con la pipeta se extrajo la leche hasta la línea indicadora

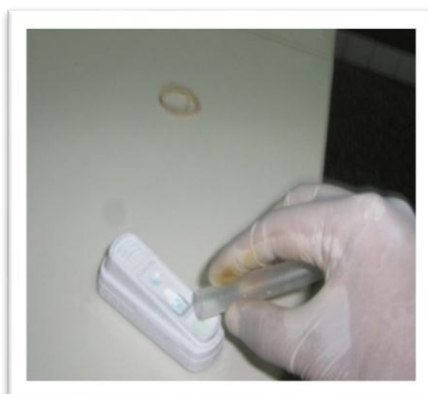


FOTO N° 20: Ejecución. Dentro de los 15 segundos de la muestra mezclada, se vertió todo el contenido del tubo de muestras en el pocillo de muestras del dispositivo SNAP.