

UNIVERSIDAD NACIONAL "HERMILIO VALDIZÁN"
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
E .A. P. MEDICINA VETERINARIA



**DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS POR
CROMATOGRFÍA LIQUIDA ACOPLADA A
ESPECTOMETRIA DE MASA EN TÁNDEM
(LC/MSMS) EN LECHE CRUDA DE VACA EN
EL DISTRITO DE BAÑOS-LAURICOCHA-
HUÁNUCO**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO VETERINARIO**

**TESISTA:
NATHALI TEÓFILA PRIMO MARQUEZ**

**HUÁNUCO - PERÚ
2015**

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso que me ha regalado la gracia de mi salud y vida.

A mis padres: Eber Clemente Primo Estacio y Zoila Maria Marquez Baltazar, por sus esfuerzos y sacrificios; a mis hermanos con quienes hemos luchado siempre para lograr nuestras metas.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Hermilio Valdizan y docentes, por haberme acogido en sus gloriosas aulas, formando a sus alumnos profesionales líderes y capaces de enfrentar los retos del nuevo milenio.

A mi asesor Mg. CUBAS BAZÁN, Praxedes; por el apoyo y orientaciones en la conducción del trabajo de investigación.

Mi profundo y sincero agradecimiento a: todos aquellos que estuvieron en el día a día, apoyándome y dándome fuerza para continuar y seguir adelante, a mi familia, amigos y a todo los profesionales que depositaron su confianza en mí persona y supieron guiarme en el camino hacia la cumbre del éxito; a todo los que me tendieron la mano cuando lo necesite, pero en especial mi agradecimiento todo los días a Dios nuestro creador.

A mis colegas con quienes compartí los mejores años de mi vida universitaria siempre los llevaré presente.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación, se realizó la recolección de muestras de leche fresca en 5 Hatos lecheros que fueron escogidos al azar en el distrito de Baños, provincia de Lauricocha y Región Huánuco; la toma de muestra se realizó aprovechando la hora del ordeño, tomado la muestra del contenedor en donde se junta la muestra, llegándose al litro de leche por muestra.; con la finalidad de determinar la presencia de residuos de antibióticos, utilizando para tal efecto el ensayo de determinación de antibióticos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría en tándem (LC/MSMS). Los análisis se llevaron a cabo en los laboratorios del SENASA – Lima –AV. La Molina. Se llevaron 5 muestras de leche cruda de vaca los cuales dieron los siguientes resultados: Determinación de betalactámicos, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas y sulfamidas; en un 100% libre de algún residuo de antibiótico de las familias mencionadas. Indicando una leche cruda de vaca libre de contaminación de antibióticos que consume la población del distrito de Baños, que es también indicativo además de la existencia de un control sanitario así como no hay evidencia del uso indiscriminado de antibióticos en vacas en producción en el distrito de Baños y la salud de los consumidores en especial de lactantes y niños, contribuyendo con la Salud Pública.

Palabras claves: Antibiótico, Hato, LC/MSMS, betalactámicos, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas y sulfamidas.

SUMMARY

In this research work, samples of fresh milk was held in 5 herds dairy that were chosen at random in the bathrooms, province of Lauricocha and Region Huánuco district; sampling was carried out using the time of milking, taken sample of the container where the sample is coupled, reaching pint of milk per sample.; in order to determine the presence of antibiotic residues, using for this purpose the assay for the determination of antibiotics by chromatography liquid coupled to mass spectrometry (LC/MSMS) tandem. The analyses were carried out in the laboratories of the SENASA - Lima - AV. The molina Took 5 samples of raw cow's milk which gave the following results: determination of betalactamitos, tetracyclines, macrolides, quinolones and sulfonamides; 100% free of any residue of antibiotic of the above families. Indicating a raw cow's milk free from contamination of antibiotics consumed by the population of the District of baths, which is also indicative as well as the existence of a health control as well as there is no evidence of the indiscriminate use of antibiotics in cows in production in the District of bathrooms and the health of consumers in particular of infants and children contributing to the public health.

Key words: Antibiotic, herd, LC/MSMS, beta-lactams, tetracyclines, macrolides, quinolones and sulfonamides.

INDICE

	Pág.
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	III
RESUMEN.....	IV
SUMMARY	V
I. INTRODUCCIÓN	09
II. OBJETIVOS.....	11
III. HIPOTESIS, VARIABLES E INDICADORES	12
IV. MARCO TEORICO.....	13
4.1 Antecedentes.....	13
4.2 Revisión Bibliográfica.....	15
V. MARCO METODOLOGICO	36
5.1 Lugar de investigación	36
5.2 Materiales	36
5.3 Recursos financieros	37
5.4 Metodología	37
5.5 Tipo y nivel de investigación	38
5.6 Diseño de la Investigación	39
5.7 Determinación de la muestra	39
VI. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	40
VII. CONCLUSIONES	50
VIII. RECOMENDACIONES	51
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
X. ANEXOS	57

LISTA DE TABLAS Y CUADROS

	Pág.
TABLA 1. Límites de antibióticos permisibles por el Codex Alimentarius (julio 2012).....	35
 <u>CUADROS:</u>	
CUADRO 1. Resultado de la CL/MSMS para la detección de β -lactámicos en las muestras de leche cruda del Distrito de Baños, 2015.	40
CUADRO 2. Resultado de la CL/MSMS para la detección de "Tetraciclinas" en las muestras de leche cruda del Distrito de Baños, 2015.	42
CUADRO 3. Resultado de la CL/MSMS para la detección de "Macrólidos" en las muestras de leche cruda del Distrito de Baños, 2015.	43
CUADRO 4. Resultado de la CL/MSMS para la detección de "Quinolonas" en las muestras de leche cruda del Distrito de Baños, 2015.	44
CUADRO 5. Resultado de la CL/MSMS para la detección de "Sulfamidas" en las muestras de leche cruda del Distrito de Baños, 2015.	45
CUADRO 6. Resultado de las encuestas realizada a los Hatos lecheros.....	47
CUADRO 7. Frecuencia que presentan las encuestas para el tipo de personal que realiza tratamiento al ganado lechero.	48
CUADRO 8. Frecuencia que presentan las encuestas para el uso de fármacos para tratar enfermedades.....	49

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Fotografía en el hato semiestabulado previo a la encuesta.....	60
FIGURA 2. Realización de 20 encuestas a 20 hatos ganaderos distintos del distrito de Baños -Lauricocha – Huánuco.	60
FIGURA 3. Indumentaria con la que se realizó la toma de Muestra.	61
FIGURA 4. Utilizando la hora del ordeño para la toma de muestra.	61
FIGURA 5. Recolección de la muestra 1L de leche por Hato, previa rotulación del recipiente.....	62
FIGURA 6. Sensibilización a los alumnos de la Facultad de Medicina Veterinaria del Distrito del Baños, sobre el trabajo de investigación.....	62

I. INTRODUCCIÓN

La leche es un producto universal de origen animal que por su alto valor nutritivo y alto grado de digestibilidad es de suma importancia en la alimentación humana. Por esta razón el control higiénico – sanitario debe ser realizado en forma estricta por los organismos competentes.

La incidencia de enfermedades en vacas lecheras requiere de la utilización de antibióticos en su tratamiento (COPRICA. 2010).

Son varios los antibióticos cuyo uso están ampliamente difundidos en la ganadería lechera, constituyéndose en los principales contaminantes de la leche, a la vez que la hace inapto para el consumo humano por contravenir el reglamento sanitario de alimentos (FAO, 2002).

El uso indiscriminado de estos fármacos, especialmente cuando no es aplicado por el profesional médico veterinario, determina su presencia en la leche con consecuencia grave en la salud del consumidor, como son: sensibilidad, resistencia, alergias, cambios en la flora intestinal (Lewis, 1967).

La leche de alta calidad debe poseer las siguientes características: 1. Debe

estar libre de todo organismo patógeno, 2. Estar libre de sedimentos y materias totales. 3. Tener un ligero sabor dulce, un gusto y aroma suave, estar libre de olores extraños 4. Cumplir con los requisitos estatales (Reyna, 2009).

Los hábitos de consumo cotidiano va aumentar el riesgo constante de la población de adquirir la leche fresca y sus derivados contaminados con residuos de antibióticos. Ello conlleva a la imperiosa necesidad de efectuar muestras continuas que faciliten su detección e impedir la comercialización del producto, en vista que estos fármacos no se metabolizan en su totalidad, ni se inactiva con la industrialización (Magariños, H. 2000).

El nivel de infusión de los antibióticos en la leche depende de numerosos factores, siendo los más importantes, el tipo de presentación de la preparación de antibióticos, utilizados (solución acuosa, pomada, preparación de acción prolongada) y el tipo de administración: vía intramamaria, intrauterina, e intramuscular (Zurich y San martin, 2004)

La finalidad del presente trabajo de investigaciones dar a conocer el grado de contaminación con residuos de antibióticos, de la leche cruda que consume la población del distrito de Baños, los que permitirá a su vez la toma de decisiones orientada a la preservación de la salud pública.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia y concentración de antibióticos en la leche cruda de vaca en el distrito de Baños-Lauricocha-Huánuco.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de antibióticos de tipo β -lactámicos en la leche cruda de vaca, en el distrito de Baños-Lauricocha-Huánuco.
2. Determinar la presencia antibióticos de tipo Tetraciclinas en la leche cruda de vaca en el distrito de Baños-Lauricocha-Huánuco.
3. Determinar la presencia de antibióticos del tipo Macrólidos en la leche cruda de vaca en el distrito de Baños-Lauricocha-Huánuco.
4. Determinar la presencia de antibióticos de tipo Quinolonas en la leche cruda de vaca en el distrito de Baños-Lauricocha- Huánuco.
5. Determinar la presencia de antibióticos de tipo sulfamidas en la leche cruda de vaca en el distrito de Baños-Lauricocha- Huánuco.

III. HIPÓTESIS, VARIABLES E INDICADORES

HIPÓTESIS

Hipótesis General:

La leche cruda de vaca contiene antibióticos en el distrito de Baños-Lauricocha-Huánuco.

Hipótesis específicas

1. La leche cruda de vaca contiene antibióticos de tipo penicilinas en la leche cruda de vaca, en el distrito de Baños-Lauricocha-Huánuco.
2. La leche cruda de vaca contiene antibióticos de tipo Tetraciclinas en la leche cruda de vaca en el distrito de Baños-Lauricocha-Huánuco.
3. La leche cruda de vaca contiene antibióticos del tipo Macrólido en la leche cruda de vaca en el distrito de Baños-Lauricocha-Huánuco.
4. La leche cruda de vaca contiene antibióticos de tipo Quinolonas en la leche cruda de vaca en el distrito de Baños-Lauricocha- Huánuco.
5. La leche cruda de vaca contiene antibióticos de tipo sulfas en la leche cruda de vaca en el distrito de Baños-Lauricocha- Huánuco.

Variables

La leche y los antibióticos

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 ANTECEDENTES:

En las explotaciones ganaderas de leche, constantemente se utilizan productos destinados a mantener en buen estado de salud al hato, especialmente los que se encuentran en producción, ya que si los animales enferman, conlleva a pérdidas económicas, por tales razones se hace uso de distintos antibióticos. Sin embargo, al aplicarlos por cualquier vía, se debe cumplir el período de retiro correspondiente a cada producto, para evitar que los residuos de dichos fármacos excretados en la leche, sean mezclados con el resto procedente de vacas sanas y sea destinado al consumo humano, además de limpiar todos los utensilios y maquinaria que haya estado en contacto con leche, de esta forma se evitan problemas en salud pública y en la industria (Alderete, 2009).

Una investigación realizada en Perú en el año 2002 en la leche fresca consumida por la población de Cajamarca, se obtuvieron muestras de mercados, tiendas y algunos fundos de dicha ciudad, para luego ser procesadas por dos métodos cualitativos y determinar la presencia de residuos de antibióticos, se usó el cultivo de la cepa *Stearothermophilus* y la prueba de difusión estándar Delvotest, trabajando 216 muestras en un período de tres

meses, los resultados obtenidos positivos a la presencia de antibióticos fueron de 20.67% de las muestras procedentes de los mercados y 21.21% de las muestras de tiendas y fundos, siendo un promedio de 20.83% de muestras contaminadas con dichos residuos (Llanos, 2002).

Otro estudio realizado en Perú en el año 2009 en la población del Callao, consistió en el análisis de la leche cruda para determinar residuos de β -lactámicos y tetraciclinas, para esto, se analizaron 40 muestras de leche cruda comercializada en mercados de dicha región durante un período de tres meses, utilizando un método cualitativo a través de un Kit Snap basado en colorimetría, el cual cumple con los límites de sensibilidad establecidos por la FDA, obteniendo como resultado 40% de las muestras positivas a residuos de β -lactámicos y no se lograron detectar resultados positivos al analizar las tetraciclinas (Guerrero, 2009).

La investigación realizada en Perú, en el mercado del Callao en el año 2009, detectó la presencia de residuos de antibióticos β -lactámicos y de tetraciclinas en muestras de leche cruda, leche UHT y leche esterilizada envasada, para esto, se empleó el Snap IDEXX como método presuntivo, obteniendo como resultado la obtención de 41.66% de muestras positivas a la presencia de residuos β -lactámicos en leche cruda, en leche UHT no se obtuvieron resultados positivos en ninguna de las muestras estudiadas y en la leche esterilizada envasada se encontró 66.66% de resultados positivos; no se detectaron residuos de tetraciclinas en ninguna de las muestras de leche evaluadas (Reyna, 2009).

4.2 REVISION BIBLIOGRAFICA

La leche

De acuerdo a la FAO (organización para la alimentación y la agricultura), la leche es el producto de la secreción mamaria, obtenido por uno o varios ordeños sin adicción o sustracción alguna; según salud pública, la leche es el producto integral del ordeño completo de vacas sanas, sin contenido de calostro.

Contaminación de la leche por antibióticos.

Los residuos más comunes y conocidos en productos de origen animal son los procedentes de medicamentos antibióticos que se emplean con fines profilácticos y terapéuticos, los cuales se han ido estudiado con mayor interés, puesto que ha sido necesario establecer un criterio muy estricto en cuanto al límite máximo de residuos, resultante de la utilización de un principio activo utilizado en un medicamento veterinario independientemente de los excipientes que lo acompañe, considerando la posible ingesta a través de alimentos contaminados y por tratamientos específicos para la erradicación de enfermedades en los humanos (Instituto Lactológico de Lekunberri, 2004).

El uso de antibióticos en las explotaciones ganaderas es una realidad y una necesidad, sin embargo, al aplicar tales fármacos se debe contar con una dosis, vía de administración, período de retiro adecuado y apropiada identificación de vacas en tratamiento para evitar contaminación accidental de la leche

procedente de vacas sanas, además se debe identificar el motivo principal para usarlos y tomar las medidas adecuadas para disminuir el uso de éstos (Engebretson, D. 2010).

El uso excesivo e inapropiado de los antibióticos, ha logrado el aumento de microorganismos resistentes, los cuales han adquirido la capacidad para resistir los efectos de determinado fármaco ante el cual eran susceptibles, debido a esto, es importante que se apliquen buenas prácticas agrícolas, veterinarias, de alimentación animal, así como de higiene en las explotaciones lecheras, para evitar la presencia de residuos de fármacos en la leche (Reyes, 2006).

Una de las razones más comunes de administrar antibióticos en una explotación lechera es la ocurrencia de casos de mastitis, la cual generalmente es tratada de forma fácil, rápida y barata con la aplicación intramamaria de antibióticos β -lactámicos. Sin embargo, de la dosis administrada, una parte es absorbida por el cuerpo y pasa al torrente sanguíneo, otra parte es inactivada por la leche y los productos generados por la infección y el resto, que es la mayor parte, es excretada en la leche durante los ordeños siguientes, siendo los animales de baja producción los que se tardan más en eliminar el fármaco; por tanto, el ordeño frecuente ayuda a diluir el antibiótico y acorta el tiempo de eliminación del mismo, además debe tenerse en cuenta que no sólo se contamina la leche de los cuartos tratados sino también la leche producida por los cuartos vecinos, posiblemente por difusión pasiva entre la sangre y la leche y también entre el tejido mamario (Magariños, 2000).

En el caso de las enfermedades o infecciones sistémicas, como las respiratorias, entéricas, casos de metritis o presencia de anaplasmosis, entre otras, se usa como antibiótico de elección algún derivado de la tetraciclina, por ser fácil de conseguir, aplicar y de precio accesible, siendo el mayor problema el uso de dosis inadecuadas, deficiente período de retiro y la falta de consulta con el médico veterinario, las tetraciclinas por ser generalmente aplicados de forma sistémica, son distribuidos a todo el cuerpo y por tanto excretados de distintas maneras, siendo la leche una de éstas, en la cual se puede encontrar aproximadamente la mitad de la concentración respecto a la cifra plasmática (Sumano y Ocampo, 1997).

Debido a que la existencia de límites máximos permitidos de residuos de antibióticos en la leche no proporciona una solución al problema, se debe hacer uso racional de los mismos, tanto en dosis como en vías de administración, además de un adecuado manejo, seleccionar ganado con buena genética y sobre todo utilizar medidas que disminuyan la incidencia de mastitis (Magariños, H. 2000).

Importancia de residuos de antibióticos en la Salud Pública

Los residuos de antibióticos en leche son perjudiciales tanto para la salud pública como para algunos procesos de la industria láctica. Al ingerir alimentos contaminados con residuos de antibióticos representan un peligro para la salud, porque éstos son capaces de producir una toxicidad de tipo crónica, causar

reacciones alérgicas de distintas magnitudes, efectos carcinogénicos, pueden estimularse bacterias antibiótico resistentes y en consecuencia el desarrollo de microorganismos patógenos, además puede causar la reducción de la síntesis de vitaminas; por otro lado, pueden presentarse irritaciones digestivas, entre otras (Brunton, 2007).

La resistencia bacteriana podría llegar a considerarse también como un problema ecológico, ya que cepas que son resistentes a algunos antibióticos no afectan solamente a las personas que están siendo tratadas, sino a otros individuos que comparten el ambiente con éstas, además muchas bacterias resistentes pueden pasar de animales a humanos y viceversa, lo cual hace difícil el tratamiento de infecciones en ambos, tomando en cuenta que todas las bacterias de un organismo son afectadas cuando se implementa un tratamiento a base de antibióticos (COPROICA. 2003).

En el caso de ingerir leche con residuos de antibióticos β -lactámicos pueden provocar reacciones adversas como erupciones maculopapulares, urticaria, fiebre, broncoespasmo, vasculitis, dermatitis exfoliativa y anafilaxia en distintos grados, pudiendo causar graves reacciones en personas hipersensibles tan solo con ingerir 40 UI de algún tipo de penicilina. Al consumir leche contaminada con residuos de tetraciclinas pueden provocarse reacciones adversas como dolor epigástrico y abdominal, náuseas, vómitos, diarreas; en personas hipersensibles al antibiótico se puede presentar fotosensibilidad por exposición cutánea al sol, en lactantes prematuros o niños en estado de desarrollo óseo y

dentario acelerado, puede causar alteraciones y disminución del crecimiento óseo, por sus propiedades quelantes de calcio y otros cationes, formando compuestos estables que interfieren en la osificación y dentición normal, sin embargo, esta situación no parece ser un fenómeno frecuente y puede ser reversible si la exposición fue durante poco tiempo (Brunton, L. 2007).

La resistencia a los antibióticos se manifiesta debido al aumento de casos dichos fármacos eran eficaces para un tratamiento y dejan de responder repentinamente de forma adecuada respecto a experiencias clínicas anteriores, es decir, algunos microorganismos adquieren resistencia múltiple al ser sometidos a bajas concentraciones de antibióticos, la posibilidad de inducir resistencia bacteriana tiene relación con la gran diversidad bacteriana que contacta con numerosos antibióticos y la habilidad de adquirir y transferir esta resistencia (Prado, 2002).

Por otro lado, la disbacteriosis consiste en eliminar las bacterias benéficas, de presencia deseable en el tubo digestivo, pueden producir dolor y picor en la boca y lengua, además de diarrea entre otros síntomas, además, pueden presentarse sobrecrecimientos, ya que algunos antibióticos son capaces de eliminar algunas bacterias pero hacen crecer otras e incluso otros microorganismos indeseables como los hongos (Instituto Lactológico de Lekunberri. 2004).

Se debe tener en especial consideración a las poblaciones más susceptibles, tales como los infantes, los adultos mayores y mujeres embarazadas, ya que

generalmente dichos grupos de personas son grandes consumidores de productos lácteos, por tanto, en caso de ser expuestos continuamente a residuos de antibióticos pueden perder sensibilidad ante éstos (Balbero y Balbero, 2006).

Importancia de residuos de antibióticos en la Industria Láctea

Por otro lado, los problemas relacionados a la industria láctea están directamente relacionados a la pérdida de la calidad de la leche, afectando mayormente a los productos fermentados, fabricación y maduración del queso; los residuos de antibiótico por tanto, provocan demora en la acidificación y coagulación, siendo ésta última deficiente; además hay disminución de la retención de agua, se puede dar el desarrollo de microorganismos indeseables y alteración de las características normales del producto, tales como cuerpo débil, textura blanda, sabor amargo y consistencia arenosa, además, reduce la producción normal de acidez y aroma durante la fabricación de la mantequilla y el yogurt (Magariños, H. 2000).

La inhibición de bacterias que participan en los procesos de obtención de derivados de leche, queso, crema, yogurt y otros, es una consecuencia de la presencia de residuos de antibióticos, produciendo pérdidas para la industria, además la tendencia del uso de antibióticos de larga acción sin prescripción médica favorece la supervivencia del problema (Zurich y San Martín, 2004).

Las bacterias utilizadas en procesos de industrialización de la leche, por efecto de los antibióticos, presentan cambios morfológicos y pueden darse casos en que los cultivos iniciadores sean reemplazados por microorganismos indeseables, provocando la inutilización del producto o convirtiéndose en peligroso para consumo humano. Por ejemplo las bacterias utilizadas en la fabricación de yogurt, tales como, *L. bulgaricus* y *Strep. Thermophilus* resultan ser de las más sensibles a los antibióticos. Además la industria se ve perjudicada en pruebas de control de calidad, como por ejemplo, en la prueba de tiempo de reducción del azul de metileno, aumenta cuando la leche está contaminada con antibióticos, clasificando la leche de forma errónea (Magariños, H. 2000).

Los estreptococos 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 (COPROICA, 2003).

Ya que en muchos casos la leche con residuos de antibióticos es mezclada con el resto de la leche libre de los mismos, un ejemplo del grado de afectación que puede representar el tratamiento con penicilina para el procesamiento industrial refiere que un tratamiento vía intramamaria de una vaca con 200 mg de penicilina G es capaz de contaminar la leche de 8.000 vacas (Prado, 2002).

Termoestabilidad de los antibióticos en leche y período de retiro del ordeño.

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, sin embargo se debe tener en cuenta que los tratamientos térmicos no son capaces de eliminar sustancias inhibitoras como los antibióticos contenidos en la leche y se tiene conocimiento que la pasteurización elimina solamente el 8% de actividad de la penicilina, y no se tienen datos que inactive o elimine sustancias como la tetraciclina (ver anexo cuadro A – 1), por lo cual, 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, aun si son sometidos a procesos de pasteurización (Amiot, 1991).

Se ha constatado que el calor o frío que se utilizan en los procesos de industrialización de leche y pasteurización no destruyen totalmente la molécula de antibióticos, la ebullición de la leche destruye 90% de residuos de tetraciclinas (COPROICA. 2003).

Sin embargo, un tratamiento térmico más exigente aplicando 90°C por 30 minutos, puede destruir el 20% de la actividad de la penicilina y la esterilización hasta un 50% (Magariños, 2000).

Por lo antes mencionado es importante tener en cuenta el período de retiro de cada producto utilizado, y se debe tener un parámetro de por lo menos 48 a 72 horas de retiro de la ordeña para evitar la contaminación del resto de leche sana (Zurich y San Martín, 2004).

Normativas para los residuos de antibióticos en leche.

En cuanto a la norma salvadoreña de productos lácteos, leche pasteurizada y ultrapasteurizada con sabor. Especificaciones NSO 67.01.15:08 y la norma salvadoreña de productos lácteos para leche cruda de vaca. Especificaciones NSO 67.01.01:06, establecen que los límites máximos para residuos de plaguicidas, metales pesados y medicamentos veterinarios, las tolerancias admitidas en la leche pasteurizada y ultrapasteurizada y aséptica con sabor son las permitidas por el Codex Alimentarius para productos lácteos y derivados (CONACYT. 2010).

Para controlar la presencia de residuos de medicamentos en los alimentos, se han establecido los límites máximos de residuos, definiéndose como el contenido máximo de concentración de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario, expresado en $\mu\text{g}/\text{kg}$ o g/kg sobre la base del peso en fresco, autorizada en la comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio. (Residuos de sustancias antimicrobianas en la leche.).

De acuerdo con los lineamientos del Codex Alimentarius, es indispensable que todas las personas que intervienen en la autorización, elaboración, venta y

suministro, prescripción y aplicación de antibióticos en el ganado productor de leche actúen dentro del marco legal y responsablemente, a fin de limitar la diseminación de microorganismos resistentes entre los animales y la presencia de residuos de éstos medicamentos en la leche, para proteger la salud pública, y cumplir con la obligación ética y la necesidad económica de conservar la salud de los animales (Reyes, 2006).

Desde el descubrimiento de los antibióticos como principal elemento de lucha antibacteriana, organismos de países de gran desarrollo lechero han dictado normas que han sido acogidas por otras naciones. Así, en 1962, la FDA, de Estados Unidos dictó normas de control de antimicrobianos y cuenta con una base de datos de los límites residuales en alimentos de origen animal estableciendo sanciones para quienes incumplan estas disposiciones. Por otra parte, en Inglaterra, algún tiempo después, el Milk Marketing Board introduce, con carácter obligatorio, un test de residuos en leche y dicta normas sobre manejo de antibióticos en la vaca lechera. A fines de la década del 60, la Organización Mundial de la Salud y otros organismos internacionales como la FAO, establecen normas con fines de información y orientación de los países miembros, respecto de las concentraciones de residuos permitidas en leche de antibióticos de uso frecuente en bovinos de leche, listado que ha ido incrementando en número de acuerdo a la incorporación de nuevos agentes antibacterianos. En la actualidad se cuenta con un listado que permite conocer las concentraciones máximas permitidas y su detección por diversos métodos (Mora y García, 2007).

Los límites máximos de residuos de Bencilpenicilinas en leche de vaca son de 4 µg/L, permitiendo una ingesta diaria de 30 µg de penicilina por persona por día (ver anexo cuadro A – 2), por lo cual los residuos de dicha sustancia deberían mantenerse por debajo de esta concentración. Por otro lado, los límites máximos de residuos de Clortetraciclina, Oxitetraciclina y Tetraciclina es de 100 µg/L, permitiendo una ingesta diaria de 0 – 30 µg/kg de peso corporal (ver anexo cuadro A – 3), el establecimiento del IDA, de un residuo medicamentoso o químico constituye una guía para conocer la cantidad máxima que puede ingerirse diariamente con el alimento sin riesgo apreciable para el consumidor (CODEX ALIMENTARIUS. 2011).

La Bencilpenicilina y la Oxitetraciclina se encuentran entre los antimicrobianos cuyos residuos han sido evaluados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud, a través del Comité.

Mixto FAO-OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, además, la tetraciclina, es un antibiótico que no ha sido aprobado para utilizarlo en ganado de producción de leche (FAO. 2012).

Período de retiro

El conocimiento de las concentraciones residuales y farmacocinética de los antibióticos, permiten establecer período de resguardo, también llamado tiempo de supresión o período de suspensión, el cual indica el tiempo en horas o días,

entre el final de una terapia sistémica o local y el momento en que las concentraciones de antibióticos en leche se encuentra en niveles de máxima tolerancia de acuerdo a normas dictadas por la Organización Mundial de la Salud o el FDA, indicando cuando la leche se encuentra apta para el consumo humano. (Ver anexo Cuadro 2).

El período de retiro es variable debido a diferentes factores como la estructura fisicoquímica del antibiótico, excipientes, condiciones de administración, farmacodinamia y cinética en la vaca lechera, por esto hay que tener en cuenta las distintas presentaciones farmacéuticas, de larga acción, acción rápida o intermedia. Los períodos de retiro varían de acuerdo al país, sin embargo se aceptan los valores establecidos por la OMS (Zurich y San Martín, 2004).

Manejo y uso racional de antibióticos en ganado lechero.

El uso racional de los antibióticos implica la restricción de los mismos en casos justificados, elegir un fármaco con la duración y dosis adecuadas; además en muchos casos podría utilizarse algún antibiótico de corto espectro y medicar únicamente a los animales enfermos y no a todo el grupo de animales, así, al hacer uso menos intensivo de antibióticos, favorece a que las cepas susceptibles compitan con las resistentes, asegurando un rápido retorno de la flora normal después del tratamiento. (COPROICA. 2003).

Debido a que una de las principales causas del uso de tratamientos antibióticos está directamente relacionada con el nivel de mastitis de cada explotación, el

establecimiento de un programa de control y prevención ante éste padecimiento es fundamental para minimizar la posibilidad de contaminar el resto de leche con antibióticos, en especial la que se encuentra en los tanques recolectores y está lista para procesos de industrialización, dicho programa debe basarse en puntos importantes como, visita periódica de un Médico Veterinario, revisión semestral de las máquinas de ordeño, adecuada higiene del establo, adecuada técnica de ordeño, tratamiento antibiótico en la lactación, manejo del período seco y la eliminación de animales con problemas crónicos. Además para evitar la presencia de antibióticos en la leche, se debe tener en cuenta la asesoría del Médico Veterinario para el uso responsable e indicado de los diferentes tratamientos antibióticos, la utilización de medicamentos registrados, legalizados y perfectamente etiquetados, respetar la especie de destino y las dosis de cada fármaco, teniendo en cuenta los períodos de supresión para no incorporar al tanque la leche de animales tratados tanto en la fase de administración del medicamento como durante el período de supresión, por lo cual no debe utilizarse fármacos que no especifiquen dicho período, también, deben identificarse las vacas tratadas, llevar un registro estricto de los tratamientos, usar una unidad de ordeño exclusiva para animales tratados y dar un correcto manejo a las vacas secas, las cuales al encontrarse en tratamiento antibiótico de secado tienen una permanencia en la ubre de 5 a 7 semanas pudiendo acortarse o alargarse, para lo cual se deberá tener en cuenta los cuidados antes mencionados con respecto a la leche de dichas vacas (Instituto Lactológico de Lekunberri. 2004).

Factores de variación de la presencia de residuos de antibiótico en leche.

La eliminación de los medicamentos de forma activa en el organismo depende de los procesos de biotransformación y excreción, el volumen de distribución y la unión del fármaco a proteínas plasmáticas, debido a esto, las vías de excreción de los medicamentos en orden de importancia son vía renal, biliar, pulmonar, mamaria, salival, secreciones gastrointestinales, cutánea y vía genital. La excreción de los agentes antimicrobianos a través de la leche depende de una serie de factores físico-químicos, como pH, solubilidad del fármaco en lípidos y unión de éste a las proteínas. A su vez, éstos factores pueden verse alterados por la enfermedad y provocar cambios sistémicos o locales en la distribución de dicha sustancia (Sumano y Ocampo, 1997). 16

Sin embargo, existen factores inherentes a la aplicación de fármacos que pueden influir tanto en la cantidad como en la duración de los tiempos de excreción, además de la presencia de sus residuos en la leche, algunos de estos factores son: La naturaleza del antibiótico, porque el carácter ácido o básico del antibiótico puede ser importante para su presencia en la leche, ya que los antibióticos básicos son los menos ionizados al pH de la leche y se difunden mejor que los de tipo ácido. La dosis administrada, ya que un aumento de ésta implica un alargamiento en la duración de la eliminación de los antibióticos inyectados por vía parenteral; en cuanto a los productos intramamarios, el incremento de la dosis también puede aumentar la duración de la eliminación. La influencia del excipiente, los fármacos inyectados por vía parenteral que poseen excipientes oleosos tienen un período de eliminación

más largo que el de los excipientes acuosos. La vía de administración, ya que el cambio de la vía de administración puede modificar la concentración del antibiótico en la leche y la duración de su período de eliminación de la dosis; y finalmente el estado sanitario de la ubre, debido a que el tratamiento contra la mamitis modifica el pH y la composición de la leche, de igual forma, los procesos de filtración entre la sangre y la leche se encuentran alterados, por lo cual el paso de antibióticos a la leche puede ser diferente si se comparan animales sanos con enfermos (Roca, 2008).

Métodos de detección de residuos de antibióticos en leche

Existen diferentes métodos que se emplean para detectar residuos en leche, sin embargo, la implementación de éstos depende del presupuesto con el que cuenta ya sea la empresa privada o el estado; el método microbiológico detecta la presencia o ausencia de un determinado fármaco y puede incluso cuantificar la concentración del mismo, debido a esto es usado habitualmente por su costo. Los test rápidos o Snap Test, tales como el BRT, BR-Test, Copan, Delvotest o Eclipse son algunos de los métodos más utilizados hoy en día y todos ellos emplean el *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, antes denominado *Bacillus stearothermophilus*, como microorganismo de prueba, son utilizados comúnmente para conocer la presencia o ausencia de determinado fármaco y basándose en el cambio de color para compararlo posteriormente con una escala. Por otro lado, entre los métodos de confirmación cualitativos, existen actualmente distintos tipos de métodos enzimáticos, inmuno enzimáticos, de

unión a receptores, que permiten detectar de una forma más específica y por lo general más rápida, la presencia de residuos de antibióticos y sulfonamidas en la leche (Residuos de sustancias antimicrobianas en la leche. sf).

En cuanto a los métodos utilizados en la fase de confirmación y cuantificación, se emplean métodos físico-químicos que se utilizan para identificar y cuantificar de una forma inequívoca la presencia de residuos de antimicrobianos en las muestras de leche, sin embargo, estos métodos son caros y muy laboriosos, y también requieren haber analizado mediante instrumentación muy precisa un amplio rango de controles positivos a diversas concentraciones conocidas para poder extrapolar mediante curvas patrón la concentración de la muestra problema. Las técnicas cromatográficas de gas y de líquidos son las que se emplean con mayor frecuencia. (Roca, MI. 2008).

Los métodos cuantitativos se basan en la capacidad de difusión del antibiótico en el medio de cultivo que contiene una determinada cepa bacteriana control, sobre el cual se colocan cilindros de acero con muestra de leche y luego se incuban por un período de tiempo, se observan los halos de inhibición proporcionales a la concentración del fármaco en cada cilindro (Zurich y San Martín, 2004).

Métodos microbiológicos para detección de residuos antibióticos en leche

Los métodos cualitativos, se clasifican en métodos microbiológicos, capaces de detectar la presencia o ausencia de un residuo en una muestra, y en métodos

de confirmación cualitativa, específicos para la detección de un determinado grupo de antibióticos. Los métodos microbiológicos están basados fundamentalmente en pruebas de inhibición del crecimiento de un microorganismo específico, empleando para la detección de esta inhibición, diversos sistemas como indicadores de pH, redox, bioluminiscencia, etc. Estos métodos aprovechan fundamentalmente la capacidad de las bacterias de producir ácido, reducir colorantes o producir halos de inhibición en un medio de cultivo, de manera que el resultado se puede interpretar visualmente. (Roca, MI. 2008).

Existen dos métodos microbiológicos oficiales según en el Manual de Análisis Microbiológicos, para detectar sustancias que inhiben los microbios en la leche, los cuales son el método de cilindro placa, usando *Micrococcus luteus* como el organismo de prueba, y el método del disco de papel. El método de cilindro placa, es el método oficial para la detección cuantitativa de residuos de antibióticos β -lactámicos. El método cilindro placa 18 para detectar penicilina en leche en polvo puede ser aplicado al ensayo de penicilina en leche líquida dado por Kramer et al. Leche entera normal es usada como diluyente control en lugar del polvo seco de leche más un diluyente control establecido por el método, la leche normal que sirve como diluyente control debe ser probado antes de ser usada en el procedimiento para asegurar que no exhibe actividad bacteriana contra el organismo de prueba. Por otro lado, no es necesaria ninguna preparación para las muestras de leche a examinar, son probadas tan pronto como son recibidas. En todos los casos, las muestras de leche deben estar

frescas. El método del disco, es el método oficial cualitativo de detección de sustancias inhibidoras en la leche, es una modificación del método aprobado por la Federación Internacional de Leche, IDF, para la detección cualitativa de penicilina en la leche (Maturín, 2001).

Peligrosidad de los residuos de antibióticos en la leche.

Las penicilinas en particular, son drogas con muy baja toxicidad (FAO/OMS, 1970). Las cefalosporinas, en cambio, son más tóxicas pero su reabsorción es escasa después de la administración oral (vooge et al 1965). Los aminoglucósidos con carácter antibiótico, como la estreptomina, dihidroestreptomina, neomicina y katamicina, tienen una toxicidad relativamente alta. Su reabsorción es limitada, pero también lo es su excreción después de una administración oral. (Mol. 1975).

La administración reiterada de tetraciclinas puede provocar disturbios en la calcificación especialmente en animales jóvenes y tejidos embrionarios(FAO/OMS, 1970).

Los polipéptidos como la bacitromina son muy tóxicas especialmente para el riñón. No obstante su reabsorción es pobre (Mol, 1975).

La aptitud de los antibióticos para producir reacciones alérgicas es variable; así se observa una sensibilización frecuente a la penicilina, estreptomina y cloranfenicol (Borrie, 1962).por el contrario, la sensibilización a las tetraciclinas es rara pero, una vez adquirida, tiene tendencia a permanecer (OMS, 1969).

Efectos de la presencia de antibióticos sobre la transformación de la leche y la fabricación de productos lácteos.

A causa de la estabilidad térmica de numerosos antibióticos, se pueden producir, y de hecho se producen, numerosas interferencias con los procedimientos de fabricación de productos lácteos que se basan en la actividad de ciertos organismos.

La presencia de antibióticos en la leche crea problemas en la industria lechera, problemas que reunimos aquí:

1. Perturbación de la acidificación y la maduración en el curso de la fabricación de quesos (ovejero y Col. 1953).
2. Retraso de la producción de ácido y la formación de aroma en la mantequilla, en el yogurt y otros productos acidificados similares (Richards, 1958) (Tramer, 1964).
3. Inhibición de los fermentos introducidos en la leche (Jepsen, 1966)
4. Invalidez de los resultados de las pruebas de control de calidad, tales como las pruebas de reductasimetría (Jaoquet, 1969).
5. Reducción de la actividad inhibidora de los fermentos frente a determinadas cepas de estafilococos patógenos y enterobacterias (FIL, 1968)

Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría

La espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se

separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por un medio de un dispositivo adecuado.

Un espectrómetro de masas será, en consecuencia, una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.

Como ya se mencionó, los procesos que tienen lugar en un espectrómetro de masas, son de naturaleza química; en consecuencia, la presencia y abundancia en el espectrómetro de determinados tipos de iones, identificables a partir de su masa, será función de la estructura química de cada compuesto; la información ofrecida por un espectrómetro de masas es, de alguna forma, comparable a la obtenida mediante una gran cantidad de reacciones de las utilizadas para la determinación de estructuras por vía química, por lo que la espectrometría de masas puede ofrecer una enorme cantidad de información sobre un compuesto determinado.

1. Introducción indirecta
2. Introducción directa
3. Introducción a partir de un cromatógrafo de líquidos. Este sistema de introducción de muestra se ha popularizado para el análisis por espectrometría de masas de mezclas de compuestos ya que la introducción se realiza directamente en fase gaseosa y el cromatógrafo realiza la separación de los diversos componentes de la mezcla.

**TABLA 1. Límites de abióticos permisibles por el Codex Alimentarius
(julio 2012).**

ANTIBIOTICO	Cantidad permisible Ug/Kg
Colistin	50
Dihidroestreptomicina/estropticina	200
Espectinomicina	200
Espiramicina	200
Gentamicina	200
Lincomicina	150
Monensina	2
Neomicina	1500
Tilosina	100
Ceftiofur	40
Clortetraciclina	100
Oxitetraciclina	100
Tetraciclina	100
Gentamicina	200

V. MARCO METODOLÓGICO

5.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Distrito de Baños; se encuentra situado a 3409 msnm. En la margen izquierda del Rio Nupe a 112 km. al sur oeste de la ciudad de Huánuco y pertenece a la Provincia de Lauricocha en la Región Huánuco.

Límites:

Norte : con el distrito de Jivia.

Sur : con los distritos de Queropalca y Jesús

Este : con el distrito de Jesús.

Oeste : con el departamento de Ancash.

5.2. MATERIALES

- **Material biológico**

En el presente estudio de Investigación se emplearon 5 muestras de Leche siendo estas de 5 Hatos ganaderos distintos, de una cantidad aproximada de 1 litro por muestra de leche de vaca cruda.

- **Instrumentos**
 - 20 guantes
 - 20 frascos de plástico desinfectados y esterilizados
 - Caja conservadora de las muestras
 - Guardapolvo y mascarilla
 - Alcohol y algodón
 - Gorro sujetador de cabello
 - Botas
 - Plumón indeleble y lapiceros
 - Cámara fotográfica

5.3. RECURSOS FINANCIEROS

- La totalidad del costo del trabajo de investigación fue financiado por el tesista.

5.4. METODOLOGÍA

➤ Fuentes, técnicas e instrumentos de recolección de datos

- **Origen de las muestras:** leche cruda de vaca procedente del distrito de Baños – Lauricocha - Huánuco. Fueron recolectadas de cinco Hatos Lecheros en producción.

- **Técnica utilizada:** Recolección de leche de tanque.

Previa desinfección de la ubre y de los pezones se realizó la limpieza y preparación de las vacas seleccionadas. Para ello se aprovechó la rutina del ordeño en el hato, que finalizó con la aplicación de una solución yodada. (Licata et al., 2004)

Se tomaron muestras directamente del tanque almacenadas después del ordeño de las vacas en estudio, mediante la inmersión de una jeringa de 100 ml en el interior del tanque , con el fin de evitar obtener leche que estuviese en contacto con el medio ambiente (Gutierrez-Chavez, 2009), que luego fue empacada en un recipiente de plástico previamente rotulado y con refrigeración a 4 C y se llevó inmediatamente al laboratorio de SENASA LIMA – AREA DE RESIDUOS TOXICOS para su respectivo análisis de Determinación de Antibióticos.

- **Instrumentos:**

Encuestas (Se utilizaron registros de encuestas para cada hato lechero) y la observación.

5.5. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

- **Descriptiva:** llamada también investigación diagnóstica, buena parte de lo que se escribe y estudia sobre lo social no va mucho más allá

de este nivel. Consiste fundamentalmente en caracterizar un fenómeno o situación concreta indicando sus rasgos más peculiares o diferenciadores.

- **Transversal:** la investigación se realizara en un lugar y tiempo determinado.

5.6. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo corresponde a un diseño no experimental.

5.7. DETERMINACIÓN DE LA MUESTRA

La población estuvo conformada por 5 Hatos lecheros distrito de Baños teniendo una población de 20 animales por hato lechero generalmente.

En cuanto a la muestra se recolectaron 5 muestras al azar de 5 hatos diferentes, se tomó solo una muestra del contenedor de leche donde se almacena el total de la leche ordeñada del día.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

CUADRO 1. Resultado de la CL/MSMS para la detección de β -lactámicos en las muestras de leche cruda del Distrito de Baños, 2015.

β -LACTÁMICOS	MUESTRA DE LECHE				
	1	2	3	4	5
Ampicilina (Ug/kg)	0	0	0	0	0
Bencilpenicilina (ug/kg)	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	0	0

Mediante la realización de la prueba de ensayo de CROMATOGRAFÍA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASA EN TÁNDEM (LC/MSMS) se determinó que no se encontraron muestras positivas que sobrepasen los límites permisibles de Ampicilina y Bencilpenicilinas correspondientes a la familia de los β -lactámicos en las muestras de leche analizadas del Distrito de Daños.

Una investigación realizada en Perú en el año 2002 en la leche fresca consumida por la población de Cajamarca, se obtuvieron muestras de mercados, tiendas y algunos fundos de dicha ciudad, para luego ser procesadas por dos métodos cualitativos y determinar la presencia de residuos de antibióticos β -lactámicos, se usó el cultivo de la cepa *Stearothermophilus* y la prueba de difusión estándar Delvotest, trabajando 216 muestras en un período de tres meses, los resultados obtenidos positivos a la presencia de antibióticos fueron de 20.67% de las muestras procedentes de los mercados y 21.21% de las muestras de tiendas y fundos, siendo un promedio de 20.83% de muestras contaminadas con dichos residuos (Llanos, 2002).

En contraste en México evaluaron la aplicabilidad de Delvotest® SP para detectar un amplio rango de antibióticos β -lactámicos, encontrando un 92% de sensibilidad y un 96% de especificidad a concentraciones de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y un valor predictivo positivo del 96% mientras que el valor predictivo negativo fue del 91%. En virtud de lo anterior y debido a que en la región de Tierra Caliente del estado de Guerrero en México se producen anualmente alrededor de 11.9 millones de litros de leche (Cervantes y col., 2002).

CUADRO 2. Resultado de la CL/MSMS para la detección de “Tetraciclinas” en las muestras de leche cruda del Distrito de Baños, 2015.

TETRACICLINAS	MUESTRA DE LECHE				
	1	2	3	4	5
Clortetraciclina (ug/kg)	0	0	0	0	0
Oxitetraciclina (ug/kg)	0	0	0	0	0
Tetraciclina (ug/kg)	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	0	0

Mediante la realización de la prueba de ensayo de **CROMATOGRFÍA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASA EN TÁNDEM (LC/MSMS)** se determinó que no se encontraron muestras positivas que sobrepasen los límites permisibles de Clortetraciclina, Oxitetraciclina y tetraciclina correspondientes a la familia de las tetraciclinas.

En México, Cruz y col. (1986), analizando 125 muestras de leche pasteurizada de diferentes marcas mediante el método de cilindro en placa, encontraron que solamente el 9.6% de las muestras resultaron libres de antibióticos, el 25% contenían penicilina, el 60% estreptomina, el 70% tetraciclina y más del 80% contenían 2 o los 3 antibióticos.

CUADRO 3. Resultado de la CL/MSMS para la detección de “Macrolidos” en las muestras de leche cruda del Distrito de Baños, 2015.

MACROLIDOS	MUESTRA DE LECHE				
	1	2	3	4	5
Dicloxacilina (Ug/kg)	0	0	0	0	0
Doxicilina (ug/kg)	0	0	0	0	0
Eritromicina (ug/kg)	0	0	0	0	0
Tilosina (ug/kg)	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	0	0

Mediante la realización de la prueba de ensayo de **CROMATOGRFÍA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASA EN TÁNDEM (LC/MSMS)** se determinó que no se encontraron muestras positivas que sobrepasen los límites permisibles Dicloxacilina, Doxicilina, Eritromicina y Tilosina correspondientes a la familia de los Macrólidos.

**CUADRO 4. Resultado de la CL/MSMS para la detección de “Quinolonas”
en las muestras de leche cruda del Distrito de Baños, 2015.**

QUINOLONAS	MUESTRA DE LECHE				
	1	2	3	4	5
Enrofloxacin (Ug/kg)	0	0	0	0	0
Ciprofloxacina (ug/kg)	0	0	0	0	0
Norfloxacin (ug/kg)	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	0	0

Mediante la realización de la prueba de ensayo de **CROMATOGRFÍA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASA EN TÁNDEM (LC/MSMS)** se determinó que no se encontraron muestras positivas que sobrepasen los límites permisibles de Enrofloxacin, Ciprofloxacina y Norfloxacino correspondientes a la familia de las Quinolonas.

**CUADRO 5. Resultado de la CL/MSMS para la detección de “Sulfamidas”
en las muestras de leche cruda del Distrito de Baños, 2015.**

SULFAMIDAS	MUESTRA DE LECHE				
	1	2	3	4	5
Sulfaclopiridazina (Ug/kg)	0	0	0	0	0
Sulfadiazina (ug/kg)	0	0	0	0	0
Sulfadimetoxina (ug/kg)	0	0	0	0	0
Sulfadoxina (ug/kg)	0	0	0	0	0
Sulfaguanidina (ug/kg)	0	0	0	0	0
Sulfamerazina (ug/kg)	0	0	0	0	0
Sulfametazina (ug/kg)	0	0	0	0	0
Sulfametazol (ug/kg)	0	0	0	0	0
Sulfametoxazol (ug/kg)	0	0	0	0	0
Sulfanilamida (ug/kg)	0	0	0	0	0
Sulfapiridina (ug/kg)	0	0	0	0	0
Sulfaquinoxalina (ug/kg)	0	0	0	0	0
Sulfatiazol (ug/kg)	0	0	0	0	0
TOTAL	0	0	0	0	0

Mediante la realización de la prueba de ensayo de **CROMATOGRAFÍA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASA EN TÁNDEM (LC/MSMS)** se determinó que no se encontraron muestras positivas que sobrepasen los límites permisibles de Sulfatiasol, Sulfaquinoxalina, Sulfapiridina, Sulfanilamida, Sulfametoxipiridazina, Sulfametoxasol, Sulfametazol, Sulfametazina, Sulfamerazina, Sulfaguanidina, Sulfadoxina, Sulfaclopiridazina, Sulfadiazina, Sulfadimetoxina correspondientes a la familia de las Sulfamidas.

Chombo (1999), analizó muestras de leche en los estados Mexicanos de Jalisco y Michoacán, encontrando 12% y 4% de positividad en dos zonas de Jalisco, mientras que en Michoacán no se detectaron muestras positivas.

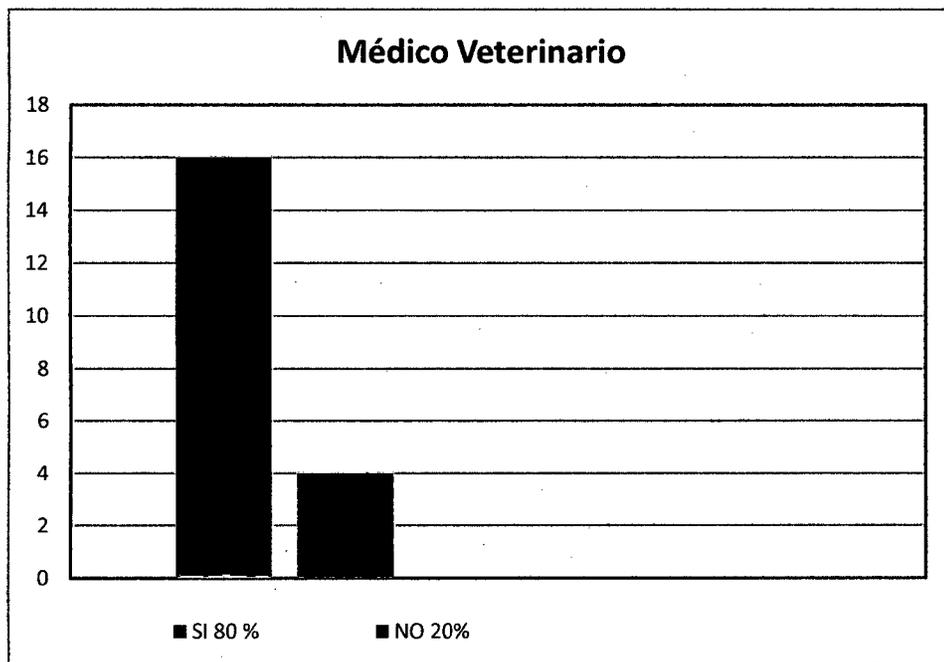
Se encuentra también pequeña diferencia con los resultados obtenidos anteriormente, por Pozo y col. (1986), en Cuba, donde 12 vaquerías de la periferia de La Habana, resultaron positivas en un 17.5% de las muestras estudiadas. Esta cercana coincidencia, puede deberse a que en su estudio se efectuó la determinación de residuos de Estreptomicina, empleando para tal efecto un método cuantitativo.

CUADRO 6. Resultado de las encuestas realizada a los Hatos lecheros.

Pregunta	Hato 1	Hato 2	Hato 3	Hato 4	Hato 5
¿Cuáles son las Enfermedades que se presentan más comúnmente?	Neumonía por temporadas	Retención placentaria Enfermedades respiratorias	Neumonía	Mastitis	Neumonía
¿Cuáles son los fármacos que se utilizan para tratar las enfermedades? (antibióticos)	No los conocen por nombre	No los conocen por nombre	No los conocen por nombre	No los conocen por nombre	No los conocen por nombre
¿El ordeño es manual o mecánico?	manual	manual	manual	manual	manual
¿Cuántos ordeños se realizan al día?	1	1	1	1	1
¿Cuántas vacas están en producción?	12	16	14	15	16
¿Asistencia Médico Veterinario? (actividades)	Solo cuando el ganado se encuentra con signos patológicos	Solo cuando el ganado se encuentra con signos patológicos	Solo cuando el ganado se encuentra con signos patológicos	Solo cuando el ganado se encuentra con signos patológicos	Solo cuando el ganado se encuentra con signos patológicos
Tratamiento de la leche post ordeño	Se recolecta, se almacena, se vende y se realiza la fabricación de queso	Se realiza la fabricación de queso	Se recolecta, se almacena, se vende y se realiza la fabricación de queso	Se recolecta para la fabricación de queso y yogurt	Se recolecta para la fabricación de queso

CUADRO 7. Frecuencia que presentan las encuestas para el tipo de personal que realiza tratamiento al ganado lechero.

¿Tiene asistencia de un médico veterinario?		
Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
SI	14	80,0 %
NO	6	20,0 %
Total	20	100,0 %



CUADRO 8. Frecuencia que presentan las encuestas para el uso de fármacos para tratar enfermedades.

¿Cuáles son los fármacos que se utilizan para tratar las enfermedades?		
Clasificación	Frecuencia	Porcentaje
Conocen	0	00,0 %
No conocen	20	100,0 %
Total	20	100,0 %

VII. CONCLUSIONES

La determinación de residuos de antibióticos en la leche cruda de vaca que consume la población del distrito de Baños, nos lleva a las siguientes conclusiones:

- Del total de muestra de leche cruda de vaca (N=5), incluidos en el presente trabajo de investigación, no se encontraron la presencia de β -lactámicos, Tetraciclinas, Macrólidos, Quinolonas y Sulfamidas. En base al criterio previamente señalado, se puede afirmar que el 100% de la leche cruda de vaca que se obtienen en los hatos ganaderos del Distrito de Baños no constituyen un peligro para la Salud Pública.
- La contaminación encontrada en la leche cruda de vaca que consume diariamente la población de distrito de Baños, responde a una de las condiciones del Reglamento Sanitario de alimentos (1986), en donde dice que la leche cruda que se expende no deberá contener sustancias conservadoras, antisépticos, plaguicidas y otros.
- Los métodos empleados para la determinación de residuos de antibióticos en las muestras de leche cruda de vaca que es la CL/MSMS, ofrecen una alta sensibilidad, existe sin embargo diferencia únicamente en la rapidez de la prueba de difusión de Standar Delvotest.

VIII. RECOMENDACIONES

- Educar y difundir a través de campañas educativas, por parte de las personas que intervienen en el proceso de producción lechera (profesionales, técnicos, ganaderos u otros) exigiendo con rigor el cumplimiento del periodo de eliminación de antibióticos (72 horas) en las vacas tratadas.
- Para garantizar la calidad sanitaria de la leche resulta indispensable, entre otras cosas, disponer de programas de muestreo adecuados y de métodos tanto cualitativos y cuantitativos que permitan detectar los diferentes antibióticos.
- Recomendamos la utilización de la prueba de difusión Stándar Delvotest, para la determinación de residuos antibióticos en la leche cruda de vaca, debido a su rapidez, fácil de realización e interpretación.
- Se recomienda también realizar investigaciones referentes al tema de investigación en cuencas lecheras crecientes.
- Para la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia se recomienda hacer la adquisición de los instrumentos utilizados para el ensayo de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem (LC/MSMS), con la finalidad de realizar uno mismo la prueba y no tener la necesidad de viajar a lima solo para dejar las muestras para analizar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alderete, A. 2009. Prevención de residuos de antibióticos en leche. (En Línea). Misión Salesiana. AR. Consultado 27 ene 2011. Disponible en: <http://www.misionrg.com.ar/antiblec.htm>
2. Amiot, J. 1991. Ciencia y tecnología de la leche: Principios y aplicaciones. Trad. RO Almudí. Ed. Fondation de Technologie Laitère du Quebec. Zaragoza, ES, Acribia. P. 90-100, 113,116.
3. CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, SV). 2010. Norma salvadoreña NSO 67.01.01:06: Productos Lácteos, Leche Cruda de Vaca, Especificaciones. (Primera Actualización). San Salvador, SV. 4p.
4. Instituto Lactológico de Lekunberri. 2004. El empleo responsable de medicamentos en explotaciones ganaderas. Legislación, Riesgos y Métodos analíticos. (En Línea). ES, se. Consultado 12 feb 2012. Formato pdf. Disponible en: www.itgganadero.com/itg/portal/documentos.asp?id=228&d=1
5. Balbero, JE y Balbero, VI. 2006. Determinación de residuos de antibióticos en leche de vaca en plantas procesadoras de productos lácteos en el Departamento de Sucre. (En Línea). Sincelejo, CO, se. Consultado 3 abr 2012. Formato pdf. Disponible en: <http://biblioteca.unisucre.edu.co:8080/dspace/handle/123456789/460>
6. Benzunce, L. Determinación de antibióticos en la campaña de Cajamarca. Tesis, Universidad Nacional de Cajamarca. 1988, p. 48.
7. Brunton, L. 2007. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Trads. JR Blengio; J Origanza; AM Pérez-Tamayo. Eds. JS Lazo; KL Parker. 11 ed. México, DF, McGraw-Hill Interamericana. P. 1127-1143, 1173-1180.

8. Cervantes, N.A., Hernández, C.E, Jiménez, G.R. Diagnóstico ganadero del estado de Guerrero. Universidad Autónoma de Guerrero. FMVZ-MSPS-Fundación Produce de Guerrero A.C. Chilpancingo, Guerrero, México. 2002. p.13.
9. Chombo, M.P. El reto que sobre calidad enfrentan los productores mexicanos, en: Dinámica del Sistema Lechero Mexicano en el Marco Regional y Global, coordinado por Martínez, B. E., Álvarez, M. A., del Valle, M.C. Plaza y Valdés Editores, México, D.F. 1999.
10. COPROICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). 2003. Los residuos de medicamentos en la leche: Problemática y estrategias para su control. Eds. ME Parra; L Peláez; JE Londoño; N Pérez; G Rengifo. Neiva, CO, El Poirá. p. 19-60.
11. Cruz, A.M.; Pérez, D.M., Velázquez, Q.F. Frecuencia de la contaminación de la leche disponible en el Valle de México con estreptomycin, tetraciclina y penicilina. Salud Pública de México.1986. Vol. 28, n°4, p. 438-432.
12. CODEX ALIMENTARIOS. 2011. Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. (En Línea). Roma, IT, FAO-OMS. P. 4, 9. Consultado 8 nov 2011. Formato pdf. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_s_2011.pdf
13. Guerrero, DM; Mofa, R; Gamarra, G; Benavides, ER; Roque, M; Salazar, ME. 2009. Detección de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en leche cruda comercializada en el Callao. (En Línea). PE, UNMSM. Consultado 12 mar 2011. Formato pdf. Disponible en: http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v12_n2/.../a05v12n2.pdf
14. Gutiérrez, G. C. Estudio de residuos de antibióticos en leche. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. 1993.

15. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2012. Anteproyecto de Límites máximos para residuos de Medicamentos Veterinarios. (En Línea). SI, se. Consultado 28 abr 2012. Formato htm. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/w0062s/W0062S06.htm>
16. Lewis, And A.K. Milk Production and control, London fourth Edition (1967).
17. Llanos, GA. 2002. Determinación de residuos de antibióticos en leche fresca que consume la población de Cajamarca. (En Línea). Revista Amazónica de Investigación Alimentaria, V2 N°2. Iquitos, PE. Consultado 22 ene 2011. Formato pdf. Disponible en: <http://www.unapiquitos.edu.pe/links/facultades/alimentarias/v22/4.pdf>
18. Magariños, H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda. Valdivia, CL, Producción y servicios Incorporados. P 53-62.
19. Mora, N y García, A. 2007. Susceptibilidad de bacterias acidolácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Pachuca MX. Tesis Lic. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 180p.
20. Morel, D 1962.- tesis doctoral veterinarie.Lyon.
21. Organización mundial de la salud, 1969.- informe técnico número 430. P.
22. Organización mundial de la salud, 1971.- comité mixto FAO/OMS de expertos en higiene de la leche. 3er informe. Roma. FAO/OMS.
23. Ovejero, S.; M. Diez and R. Pascual 1953
24. Pozo del, E., Rivero, L., García, M. Presencia de penicilina, estreptomycin y tetraciclina en leche fresca procedente de dos plantas pasteurizadoras de la provincia de la Habana. Rvta. Cub. Cienc. Vet. 1987, p. 27-30.

25. Prado, G; Carabias, R; Rodríguez, E; Herrero, E. 2002. Presencia de residuos y contaminantes en leche humana. (En Línea). Revista Española de Salud Pública 76 (2): 133 – 147. ES. Consultado 2 feb 2012. Formato pdf. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/170/17076207.pdf>
26. Residuos de sustancias antimicrobianas en la leche. sf. (En Línea). Tesis Dr. Valencia, ES. Universidad Politécnica de Valencia. 180 p. Consultado 18 mar 2012. Formato pdf. Disponible en: <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/1977/tesisUPV2193.pdf>
27. Reyes, BR. 2006. Acciones para evitar los efectos indeseables de la aplicación de antibióticos al ganado productor de leche. 4p. (En Línea). MX, se. Consultado 16 mar 2012. Formato doc. Disponible en: www.cofocalec.org.mx/docs/Antibioticos%20en%20leche.doc
28. Reyna, GE. 2009. Detección de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en leche comercializada en el mercado del Callao. (En Línea). Ed. JC Merino. Ciencia y Tecnología 12 (1): 25-31. Callao, PE, Editorial Universitaria. Consultado 25 ene 2012. Formato pdf. Disponible en: http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/eu/Revista_Ciencia_yTecnologia/CienciaTecnologia12.pdf
29. Roca, MI. 2008. Termoestabilidad de sustancias antimicrobianas en la leche. (En Línea). Tesis Dr. Valencia, ES. Universidad Politécnica de Valencia. 225 p. Consultado 24 abr 2012. Formato pdf. Disponible en: riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/3022/tesisUPV2884.pdf
30. Sumano, HS y Ocampo, L. 1997. Farmacología Veterinaria. 2 Ed. México, DF, McGraw-Hill Interamericana. p. 118-127, 148-154.
31. Tramer, J. 1964.- J.Soc.Dairy Tec

32. Zurich, L y San Martín, B. 2004. Residuos antimicrobianos en leche: Normas sanitarias y conceptos de residuos. 1994. (En Línea). Monografías de Medicina Veterinaria, V16 N° 1 y 2. CL, SISIB. Consultado 19 abr 2011. Disponible en <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/>

ANEXOS

**ENCUESTA REALIZADA A EXPLOTACIONES PECUARIAS SOBRE MANEJO DE
GANDO BOVINO Y PRODUCCIÓN LACTEA**

Nombre y ubicación de la de la explotación _____

Nombre del encargado: _____

SALUD ANIMAL

1) ¿Cuál es el plan de prevención que se emplea en la explotación?

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

3) ¿Cuáles son los tratamientos que se efectúan para controlar estas enfermedades?

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

MANEJO DEL HATO

1) ¿Qué tipo de manejo se le da al ganado? (estabulado, semiestabulado, etc.)

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

3) ¿El ordeño es manual o mecánico?

4) ¿Cuántos ordeños se realizan al día?

5) ¿A qué edad se desteta a los temeros?

CARACTERISTICAS DEL GANADO

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

2) ¿Cuántas vacas están en producción?

3) ¿Los servicios se realizan por monta natural o inseminación artificial?

4) ¿A qué edad se sirven las novillas?

5) ¿Cuántos partos da una vaca en toda su vida útil?

6) ¿Cuál es el encaste que se maneja en la propiedad?

COMERCIALIZACION

1) ¿Cuáles son las actividades que se realizan en la explotación?

2) ¿Quiénes son los compradores de la leche?

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

4) ¿Cuál es el precio del litro?

VISTAS FOTOGRÁFICAS

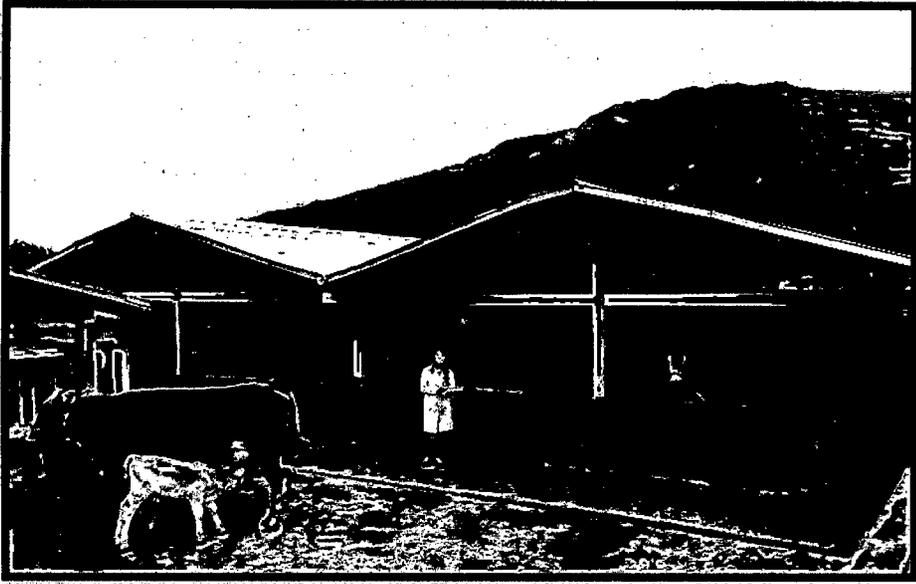


FIGURA 1. Fotografía en el hato semiestabulado previo a la encuesta.



FIGURA 2. Se realizó 20 encuestas a 20 hatos ganaderos distintos del distrito de Baños -Lauricocha – Huánuco.

- Toma y recolección de muestras:



FIGURA 3. Indumentaria con la que se realizó la toma de Muestra.



FIGURA 4. Se utilizó la hora del ordeño para la toma de muestra.



FIGURA 5. Recolección de la muestra 1L de leche por Hato, previa rotulación del recipiente.



FIGURA 6. Sensibilización a los alumnos de la Facultad de Medicina Veterinaria del Distrito del Baños, sobre el trabajo de investigación.

NOTA BIOGRÁFICA

NATHALI TEÓFILA PRIMO MARQUEZ

Nací en 1992 en la ciudad de Llata – Huamalies.

A los 5 años de edad realicé mi educación inicial en la I.E “030 de Llata”, mis estudios de educación primaria lo realicé en la I.E “Cesar O. Vergara Tello” culminando a los 11 años de edad, mis estudios de educación secundaria lo realicé en la I.E “Nuestra Señora de las Mercedes” culminando a los 16 años de edad,

mis estudios universitarios lo realicé en la Universidad Nacional “Hermilio Valdizan” de Huánuco, estudiando la carrera de Medicina Veterinaria el cual culminé satisfactoriamente el presente año 2015.





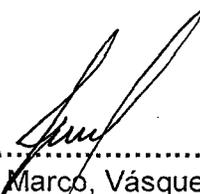
ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MEDICO VETERINARIO

En la ciudad de Huánuco, Cayhuayna - Distrito de Pillco Marca, a los VEINTITRES días del mes de NOVIEMBRE del 2015, siendo las 11.A.M. horas, de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos se reunieron en el Auditorio de la Facultad, los Miembros integrantes del Jurado examinador para proceder a la Evaluación de Sustentación de la Tesis Titulada: "**DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS POR CROMATOGRFÍA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASA EN TÁNDEM (LC/MSMS) EN LECHE CRUDA DE VACA EN EL DISTRITO DE BAÑOS - LAURICOCHA - HUÁNUCO**", de la Bachiller **Nathali Teófila, PRIMO MARQUEZ** para **OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO**, estando integrado por los siguientes miembros:

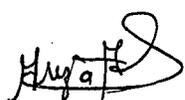
- Mg. Juan Marco, Vásquez Ampuero (PRESIDENTE)
- Mg. Rosel Apaestegui Livaque (SECRETARIO)
- Mg. Ernestina Ariza Avila (VOCAL)

Finalizado el acto de sustentación, los miembros del Jurado procedieron a la calificación, cuyo resultado fue APROBADO, con la nota de DIECISIETE (17), con el calificativo de: MUY BUENO

Con lo que se dio por finalizado el proceso de Evaluación de Sustentación de Tesis. Siendo a horas 12 P.M., en fe de la cual firmamos.


.....
Mg. Juan Marco, Vásquez Ampuero
PRESIDENTE


.....
Mg. Rosel Apaestegui Livaque
SECRETARIO


.....
Mg. Ernestina Ariza Avila
VOCAL