

“DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE FRESCA QUE CONSUME LA POBLACIÓN DE CAJAMARCA”.

Gladis A. Llanos Cortesana

Médico Veterinario: Docente de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana
(Tesis para optar el título)

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación, se realizó la recolección de muestras de leche fresca en los diferentes lugares de expendio como: mercados, tiendas y algunos fundos de la ciudad de Cajamarca, con la finalidad de determinar la presencia de residuos de antibióticos, utilizando para tal efecto los métodos cualitativos del cultivo de la cepa *Stearothermophilus*, y la prueba de difusión estándar Delvotest.

Los análisis se llevaron a cabo en los Laboratorios: Regional del Norte (LABRENOR) y en la Industrias Cajamarquinas Lácteas (INCALAC), del Distrito Baños del Inca, Provincia de Cajamarca. Se trabajaron 216 muestras de leche fresca, entre diciembre 1990 a febrero 1991, los cuales dieron los siguientes resultados.

- En mercados, de 50 vendedores, se obtuvieron 150 muestras de leche, resultando 31 positivos a la presencia de antibióticos, lo que significa el 20.67%

- En tiendas y fundos, de 22 vendedores se trabajaron 66 muestras de los cuales 14 fueron positivas lo que hace un 21.21% de positividad a la presencia de antibióticos en la leche fresca.

- Los resultados en promedio (20.83%) indican un alto nivel de contaminación con antibióticos de la leche fresca que consume la población de Cajamarca, que es indicativo además de la inexistencia de un control sanitario en la comercialización de leche fresca, así como evidencia el uso indiscriminado de antibióticos en vacas en producción en la campiña de Cajamarca y el serio riesgo que significa para la salud de los consumidores en especial de lactantes y niños.

Palabras claves: cepas, *Bacillus stearothermophilus*, residuos de antibiótico, delvotest, leche fresca

1. INTRODUCCIÓN

La leche es un producto universal de origen animal que por su alto valor nutritivo y alto grado de digestividad 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 las vacas lecheras requiere de la utilización de antibióticos en su tratamiento.

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.

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. 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 (Judkins *et al.*, 1984).

Los hábitos de consumo cotidiano va a estribar el riesgo constante de la población de adquirir la leche fresca o 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 de que estos fármacos no se metabolizan en su totalidad, ni se inactiva con la industrialización (Benzunze 1988).

El nivel y la duración de la infusión de antibióticos en la leche depende de numerosos factores, siendo los mas 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) (Technical Management Communications 1991).

La finalidad del presente trabajo de investigación es dar a conocer el grado de contaminación con residuos de antibióticos, de la leche fresca que consume la población de Cajamarca, los que permitirá a su vez la toma de decisiones orientada a la preservación de la Salud Pública.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestras Biológicas

Para la ejecución del presente trabajo se recolectó un total de 216 muestras de leche, proveniente de 72 vendedores que expenden sus productos diariamente en los mercados, en tiendas y algunos fundos, de la ciudad de Cajamarca. Así mismo se utilizó muestras de leche libre de antibióticos.

2.2 Materiales de Laboratorio

Frascos de 100, 10 y 5 mL limpios y estériles, pipetas graduadas de 1 mL, placas petri, varillas agitadoras, cajas porta placas, canastillas, cilindro porta pipetas, ampollas con *Bacillus stearothermophilis*, tabletas nutritivas, jeringas dosificadoras, pipetas descartables, pinzas plásticas, fichas de trabajo.

2.3 Equipo

Autoclave, estufa, horno eléctrico, mechero, refrigerador, incubador seco, baño maría.

2.4 Reactivos y medios de cultivos

Dextrosa, triptona, extracto de levadura, agar

para recuento en placa, cepas de *B. Stearothermophilus*, discos de antibióticos, penicilina de 15,000 U.I.

2.5 Metodología

Se emplearán dos métodos de laboratorio para la determinación de residuos de antibióticos en leche fresca.

Primer método: cultivando la Cepa de *B. Stearothermophilus*.

Segundo método: empleando la prueba de Difusión Estándar Delvotest.

5.1 Recolección y transporte de muestras

Se recolectaron muestras de leche empleando un cucharón metálico limpio. Cada muestra de 50 mL fueron depositados en frascos limpios y estériles. Luego fueron transportados en condiciones ambientales al laboratorio para su procesamiento en forma inmediata.

La recolección y las pruebas se realizaron en 3 muestreos con intervalo aproximadamente de 15 días en el lapso que duró el trabajo.

2.5.2 Descripción del método de cultivo de la Cepa *B. Stearothermophilus*

a) Preparación de caldo triptona

- Triptona 5,0 g
- Yeast extracto 1,0 g
- Dextrosa 0,05 g
- Agua destilada 100 mL

Este medio debe tener de un pH 8, luego se reparte 10 mL en frascos pequeños, se esterilizarlo a 121°C durante 15 minutos y a 15 libras de presión.

Seguidamente los frascos con triptona fueron inoculados con la cepa de *B. Stearothermophilus* e incubados a 55°C durante 18 h.

b) Preparación del agar de recuento en placa

- Agar de recuento en placa 2,35 g
 - Agua destilada 100 mL
- Ajustarse a un pH 8.

Estos ingredientes fueron depositados en un matraz limpio y agitando hasta disolverlos, se repartió 5 mL en cada frasco pequeño y se procedió a esterilizarlo a 121°C durante 15 minutos a 15 libras de presión. Se dejó enfriar y finalmente se conservó en refrigeración hasta el momento de trabajarlo.

c) Realización de la prueba

Los frascos con el agar de recuento fueron colocados en baño María a 45°C, una vez disuelto éste se vertió en la cantidad de 3 mL, en una placa petri estéril, se agregó 1 mL de caldo cultivado con la cepa de *B. Stearothermophilus* y al final los 2 mL restantes del medio licuado (agar de recuento).

La placa con la siembra respectiva, es agitada en forma rotatoria por unos minutos, luego se dejó enfriar.

La placa con el medio solidificado se invierte para ser divididos en 12 recuadros numerados del 1 al 12), de 1 cm² cada uno utilizando el lápiz de cera.

d) Preparación de la Solución de Penicilina

a) Matraz I. se coloca 150 mL de agua destilada estéril, se agrega una pastilla de penicilina en 15,000 U.I. agitando suavemente hasta disolverlo.

b) Matraz II. Se coloca 99 mL, de agua destilada estéril, se agrega 1 mL, de la solución del matraz I.

c) Matraz III. Se coloca 49 mL, de leche fresca libre de antibióticos luego se agrega 1 mL de la solución de matraz II.

e) Preparación de los discos

Los discos utilizados en la placa, son de celulosa de 4 mm de diámetro.

De los discos anteriores se toma con una pinza estéril 3 de ellos, estos son embebidos en la solución del matraz III.

Estos vienen a ser discos controles identificados con los números 2, 3 y 9 que corresponden a los recuadros enumerados de la placa con el cultivo.

Nueve discos son embebidos en las muestras de leche problema, los que son colocados en el recuadro numerados con los números 1, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12), respectivamente de la placa con cultivo. Esta operación se realiza usando una pinza estéril.

f) Lectura de resultados

La placa de cultivo que lleva los 12 discos es identificado, se encuba a 55°C por dos horas y media.

Después del período de incubación los discos controles números 2, 3 y 9, presentarán un halo transparente que significa inhibición del desarrollo del bacillus como consecuencia de la presencia de penicilina en el disco.

Esta reacción observaremos en los discos embebidos con la leche problema que contiene trozos de antibióticos.

Cuando no se presenta el halo transparente, indica que la leche no contiene antibióticos, y como consiguiente el resultado es negativo.

La formación del halo transparente indica la presencia de antibióticos, cuando mayor es el halo, mayor es la concentración.

2.5.3 Descripción de la prueba de difusión Estándar Delvotest.**a) Realización de la prueba**

Abrir la tapa de aluminio de las ampollas (que contienen el Bacillus) para cada muestra de leche problema.

Colocar con la pinza, una tableta nutritiva en las ampollas.

Con ayuda de una micropipeta en condiciones estériles, coger 0.1 mL de muestra de leche y depositar en la ampolla sobre el agar y la tableta.

Se colocan las ampollas en el calentador o baño maría a 64°C, durante 2 ½ horas.

b) Condiciones de conservación

Las ampollas y los frascos que contienen las tabletas nutritivas deben mantenerse a una temperatura de 6 – 15°C.

Antes de abrir los frascos de las tabletas nutritivas hay que dejarlos adaptarse a la temperatura ambiente durante 20 minutos.

Una vez que el frasco ha sido abierto, se mantendrá a una temperatura de 15 – 25°C, con el fin de evitar la condensación en el frasco (El tapón de silicato se dejará puesto en el frasco)

c) Lectura de los resultados de la prueba

Amarillo: No contiene ningún residuo de antibióticos o sulfamidas.

Purpureo: Contiene residuos de antibiótico o de sulfamidas.

Amarillo/purpureo: Resultado dudoso.

d) Analisis de datos

Se utilizó la estadística descriptiva, promedio, porcentaje y representación gráfica con diagrama de barras.

4. RESULTADOS

En la Tabla 1 se indican los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Tabla 1: Determinación de la presencia de residuos de antibióticos en leche fresca que consume la población de Cajamarca.

Lugares de expendio	Muestras analizadas	Números y porcentajes de muestras positivas	
		N°	%
Mercados	150	31	20,67
Tiendas y Fundos	66	14	21,21
Total	216	45	20,83

Tabla 2: Muestras positivas y negativas por muestreo en la determinación de residuos de antibióticos en la leche fresca que consume la población de Cajamarca.

Muestra	Número y porcentaje por muestreo						Total	Porcentaje
	M ₁		M ₂		M ₃			
	N°	%	N°	%	N°	%		
Positivas	14	19,4	21	29,2	10	13,9	45	20,83
Negativas	58	80,6	51	70,8	58	86,1	171	79,17
Total	72	100	72	100	72	100	216	100

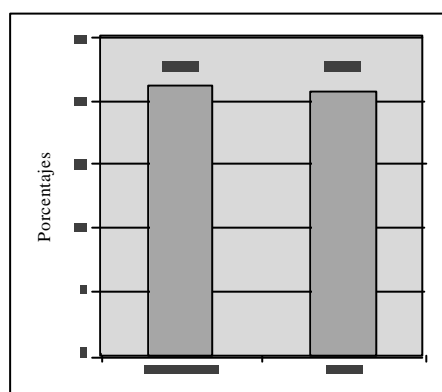
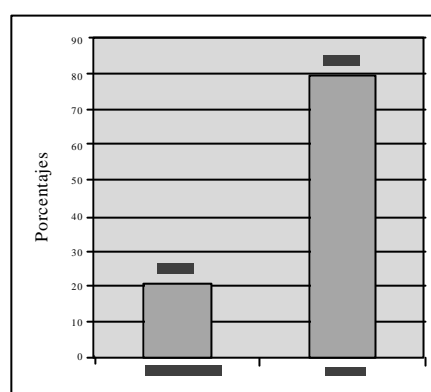
M₁ M₂ M₃ = Muestreo

Tabla 3: Comparación de las dos pruebas para determinación de residuos de antibióticos en la leche fresca

Lugares de expendio	Muestras Analizadas	N° de muestras positivas a las pruebas de antibióticos		(% de Positivo)
		Cepa	P. D. St. Delvotest	
Mercados	150	31	31	20,67
Tiendas y fundos	66	14	14	21,21
Total	216	45	45	20,83

P.D.St = Prueba de Difusión Standard

% = Porcentaje

**Figura 1:** Presencia de antibióticos en la leche fresca que consume la población de Cajamarca (mercados, tiendas y fundos)**Figura 2:** presencia y ausencia de residuos de antibióticos en la leche fresca que consume la población de Cajamarca

5. DISCUSIONES

Como se puede observar en la Tabla 2, de las 216 muestras de leche analizadas, resultaron positivas, un 20,83% y 79,17% resultaron negativas. El estudio efectuado revela presencia de residuos de antibióticos en la leche fresca que consume la población de Cajamarca.

De un trabajo similar efectuado en cinco rutas de la campaña de Cajamarca, Benzunce (1988), encontró 11,5% de positividad a la presencia de residuos de antibióticos en la leche fresca. Esta diferencia podría deberse a las formas de interpretación de las pruebas de determinación de residuos de antibióticos en la leche fresca. Nuestro resultado es mucho mas alto, en vista de que en el presente

trabajo se emplearon métodos cualitativos, donde se consideran positivos la formación del halo de inhibición, y el cambio de color (Delvotest). No obstante al analizar el trabajo de Benzunce (1988) ruta por ruta, se da cuenta que la ruta 73 tiene de positividad un 25.75%, la cual es muy superior a la nuestra.

Si se compara los porcentajes de positividad en mercados 20.67%, tiendas y fundos con 21.21%, tales resultados tienen similitud, lo que es indicativo de que el nivel de contaminación es indiferente a los mencionados lugares, esto indica que la mayoría de expendedores son pequeños ganaderos o revendedores, los mismos que no cuentan con asesoramiento técnico y administran a los fármacos indiscriminadamente en forma empírica.

Nuestro resultado difiere de los obtenidos por Pozo *et al.*, (1987), quienes trabajaron en dos pasteurizadoras de la ciudad y una provincia de La Habana (Cuba); allí encontraron 49.43% y 36.11% de positividad a la presencia de residuos a antibióticos en leche fresca, resultados muy superiores a los nuestros. Esto posiblemente se debe a uso indiscriminado de antibióticos en la ganadería lechera cubana.

Encontramos también diferencias con los resultados obtenidos por Pozo *et al.*, (1986), en Cuba en donde 12 vaquerías de la periferia de La Habana, el 17,5% de las muestras estudiadas resultaron positivas. Esta cercana coincidencia, pensamos se deba a que en su estudio se efectuó la determinación de residuos de Estreptomina, empleando para tal efecto un método cuantitativo.

El nivel de contaminación de leche fresca con residuos de antibióticos fue 20,83% obtenidos en este trabajo, resulta perjudicial para la salud humana, así lo corrobora Veisseire (1988), quien afirma que la ingestión de leche con penicilina puede provocar una antibioresistencia con infecciones ulteriores rebeldes en los lactantes que la ingieren.

De igual modo, se encuentran marcadas

diferencias con los reportes de Technical Management Communications (1991). En Grecia y Dinamarca donde 2,0 y 0,0035% de muestras de leche son positivas a antibióticos. Estos resultados son inferiores a los nuestros debiéndose, entre otros factores, al control estricto y a las condenas y/o castigos impuestos a la leche contaminada en dichos países. Así mismo los criterios de rechazo y/o condena de la leche con antibióticos en países como Alemania es considerada no detectable, Bélgica, la penicilina menos a 0,004 mg/1mL, España rechaza con 0,004 mg/1mL, Francia desclasificación de la leche, se corrobora esta forma y las condiciones de calidad requeridas, debido a los bajos niveles de contaminación.

6. CONCLUSIONES

La determinación de residuos de antibióticos en la leche fresca que consume la población Cajamarquina, no lleva a las siguientes conclusiones:

De las 216 muestras de leche fresca analizadas, 4.5 resultaron positivas a la presencia de residuos de antibióticos alcanzando un porcentaje 20,83% de positividad.

No hay diferencia en la presencia de residuos antibióticos en la leche fresca que se comercializa en los diferentes lugares de expendio (20,67% en mercados y 21,21% en tiendas y fundos).

La contaminación encontrada en la leche que consume diariamente la población de Cajamarca, no 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, antibióticos, plaguicidas u otros).

No existe un control sanitario para determinar la presencia de antibióticos en leche fresca, por parte de las autoridades pertinentes, pues ellas son las responsables de hacer cumplir lo estipulado por el Código

Sanitario.

Con los resultados del presente trabajo, podemos decir que existe un uso indiscriminado de los antibióticos en el tratamiento de las vacas lecheras por técnicos, ganaderos y no son controlados especialmente cuando esta leche va a la comercialización.

La frecuencia de residuos antibióticos encontrados, en la leche fresca, se ha incrementado en un 9,33% con respecto al estudio realizado tres años atrás (Benzunce, 1988).

Los métodos empleados para la determinación de residuos de antibióticos en muestras de leche fresca, ofrecen una alta sensibilidad, existe sin embargo diferencia únicamente en la rapidez de la prueba de difusión Estádar Delvotest.

7. RECOMENDACIONES

Realizar un control sanitario estricto y severo de la leche, condenándose aquella que resulte contaminada con antibióticos, por atentar contra la salud pública.

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 período de eliminación del antibiótico (72 horas) en las vacas tratadas.

La Municipalidad debe establecer un programa, a mediano y largo plazo, que permita el expendio exclusivo de la leche pasteurizada a la población, eliminándose paulatinamente el porongueo, como medida de higiene.

Se debe empadronar a todos los proveedores y vendedores de leche, con la finalidad de orientar sobre el riesgo y peligro de la contaminación por antibióticos.

El estudio efectuado reveló la presencia de penicilina en leche fresca, tales resultados nos permite recomendar que se debe continuar con trabajos de determinación de

residuos de antibióticos, de uso común en la campaña de Cajamarca.

Para garantizar la calidad sanitaria de la leche resulta indispensable, entre otras cosas, disponer de programas de muestreo adecuados y de métodos tanto cualitativos como cuantitativos que permitan detectar los diferentes antibióticos.

Deben idearse métodos rápidos, sencillos y precisos, de bajo costo para detectar residuos de antibióticos en la leche. Así mismo, un sistema de marcado o coloreado para los diferentes antibióticos de uso veterinario.

Recomendamos la utilización de la Prueba de Difusión Standar Delvotest, para la determinación de residuos antibióticos en leche fresca, debido a su rapidez, fácil de realización e interpretación.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Benzunce L. Determinación de antibióticos en la Campaña de Cajamarca. Universidad Nacional de Cajamarca. Tesis 1988 – Pag.48. (1988)
- Blood y Herdenson Medicina Veterinaria. Nueva Editorial Interamericana. Quinta Edición. México. (1986)
- Centro Regional de Ayuda Técnica (AID) México . (1967)
- Comité Mixto FAO/OMS de Expertos de Higiene de la Leche: Tercer Informe. FAO: Estudios Agropecuarios N° 83, Organización Mundial de la Salud. Serie de informes técnicos N° 453.
- Charles A. Ciencias de la leche. Editorial Esparza, Segunda Edición. España. (1980)
- Fernandez, A. Calidad higiénica de la leche cruda. Tomo I, Centro Tecnológico de la leche. Instituto Nacional de Capacitación Profesional. Valdivia – Chile, 1980, Pag. 197 (1980)
- Fuentes V. Farmacología y terapéutica Veterinaria, Editorial UTEA, Segunda Edición

- México. (1986)
- Judkins N.; F y Keener H. La leche, su producción y sus procesos industriales, Editorial Continental, 2da. Edición. (1984)
- Lampert L. M. Modern. Dairy Products, Edition Chemical Publis Hing Company. INC New Cork USA. Pag. 437. (1975)
- Lewis, And. A. K. Milk Production and Control, London Founth Edition. (1967)
- Manual Merk. Merck de Veterinaria, EEUU Editorial Mek Co Rahway (1970)
- Meyer Jones L. Farmacología y terapéutica Veterinaria, Editorial UTEA, Primera Edición México. (1980)
- Ministerio de Salud. Código Sanitario de Alimentos D.S.N. 0014-86 S.A.
- MILK PRODUCER.M.M.B.OF ENGLAND AND WALES SURREY, England. Pag. 52 (1990)
- Pozo del E.; Rivero L.; García. M. Presencia de penicilina, Estreptomicina y Tetraciclina en leche fresca procedente de dos plantas pasteurizadoras de la Provincia de La Habana. Rvta. Cub. Cienc. Vet Cuba – Pag. 27 - 30. (1987)
- Pozo del E.; Rivero L.; García. M. Determinación de residuos de Estreptomicina en muestras de leche, proveniente de algunas vaquerías de la Periferia de La Habana. Rvta. Cub. Cienc. Vet Cuba – Pag. 145-148. (1986)
- Shmidt G. Biología de la lactancia. Editorial Acribia. Segunda Edición. España. (1971)
- Technical Management Communications. Communications, Desarrollo de la Reunión sobre calidad de la leche fresca Cía. Nestlé Limitada Verey Suiza – Pag 56 (1991)
- Walter Col. Introducción a la microbiología. Editorial Continental. Segunda Edición. México. (1980)
- Veisseyre Roger. Lactancia Técnica Editorial Acribia. Segunda Edición España. (1980).