



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE CRUDA
DE CABRA QUE SE EXPENDE EN EL SUR DEL DISTRITO
METROPOLITANO DE QUITO MEDIANTE TIRAS REACTIVAS.

Autora

Estéfany Alexandra López Gavilánez

Año
2018



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE CRUDA
DE CABRA QUE SE EXPENDE EN EL SUR DEL DISTRITO
METROPOLITANO DE QUITO MEDIANTE TIRAS REACTIVAS.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Médico Veterinario y Zootecnista

Profesor Guía

David Francisco Andrade Ojeda

Autor

Estéfany Alexandra López Gavilánez

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Identificación de residuos de antibióticos en la leche cruda de cabra que se expende en el sur del Distrito Metropolitano de Quito mediante tiras reactivas, a través de reuniones periódicas con la estudiante Estéfany Alexandra López Gavilánez, en el semestre 2017- 2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

David Francisco Andrade Ojeda.
Médico Veterinario y Zootecnista
CI: 1712693165

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Identificación de residuos de antibióticos en la leche cruda de cabra que se expende en el sur del Distrito Metropolitano de Quito mediante tiras reactivas, de Estéfany Alexandra López Gavilánez, en el semestre 2017- 2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Juan José Pesántez Valdivieso
Médico Veterinario y Zootecnista
CI: 1716395791

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Estéfany Alexandra López Gavilánez

CI: 1717836702

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Germán y Elicia por siempre brindarme su amor y su apoyo en los momentos más difíciles. Gracias por la vida y por haber formado la persona que soy ahora, además de guiarme a lo largo de este recorrido. A mi hermano Germán A. por ser mi cajita de secretos y mi soporte siempre. A Malau por estar pendiente de mí como una hermana en todo momento.

A David Andrade, mi tutor, quien supo dirigir y orientar la presente investigación; gracias por la confianza puesta en mí y por los consejos que ayudaron a culminar este gran capítulo de mi vida. Al Dr. Carlos Gómez y Dra. María Inés Baquero por brindarme su conocimiento y apoyo haciendo más fácil mi trabajo en las instalaciones del Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Universidad Central de Ecuador a lo largo de esta investigación. A Emilie y Pamela quienes sin compromiso alguno pusieron su granito de arena en esta investigación y han sido pilares de apoyo a lo largo de esta carrera. A Gaby y Henry por ser el mejor equipo de cirugía y de trabajo

DEDICATORIA

A mi familia por ser los que me motivan y me apoyan cada día, gracias por enseñarme a creer en mis sueños y sobre todo gracias por ayudarme a conseguirlos.

A mis amigas y amigos: Emilie, Pamela, Erika, Greomary, Nathalie, Gaby, Henry y Esteban; su amistad no se compara a ninguna otra. Con ustedes todo ha sido más fácil.

A los Dres. Carlos Martínez y Santiago Prado por ser un ejemplo a seguir y además por ser excelentes médicos, profesores, amigos y confidentes.

Finalmente a mi Rodis, por ser mi paciente más gruñón y uno de los más difíciles pero sobre todo gracias ser mi compañero de cuatro 4 durante 19 años y a Chimichanga por ser el chihuahua más cómico y tierno.
Gracias por dejarme ser su médico de cabecera.

RESUMEN

La venta de leche cruda de cabra en diversos sectores del sur del Distrito Metropolitano de Quito se ha convertido en una actividad cotidiana.

Las personas salen a tempranas horas de la mañana en busca de este producto, aseguran que tiene propiedades curativas para diversas enfermedades del tracto respiratorio, además que contribuyen al sistema inmune. Sin embargo, de acuerdo a un estudio anterior, esta leche posee residuos de antibióticos que podrían ser perjudiciales para el consumo humano.

En la presente investigación se planteó como objetivo identificar la presencia de antibióticos en esta leche y la frecuencia de aparición, para esto se recolectaron 90 muestras de leche cruda proveniente de diversas cabras del sur de Quito. Mediante el uso del Kit de prueba TRISENSOR®, se identificó la presencia de residuos de antibióticos en esta leche que es destinada a la venta y consumo humano.

En los resultados se obtuvieron 15 muestras positivas y las frecuencias de aparición de los diferentes tipos de antibiótico fueron: 93,33% (n=14) positivos a betalactámicos, 6,66% (n=1) arrojaron positivo a tetraciclinas, y finalmente 0% para sulfaciclinas.

Al concluir con el estudio, se evidenció que los porcentajes de antibióticos presentes en la leche son altos y que, además, este problema no solo ocurre a nivel nacional sino también a nivel mundial los resultados fueron comparados con estudios similares en producciones lácteas de países como: España, México, Colombia, Nicaragua y El Salvador, dando todos como positivos a trazas de antibiótico, lo que convierte a esto en un problema de salud pública.

Palabras clave:

Leche cruda, cabras, lácteo, Quito, trazas, residuos, antibióticos, tetraciclinas, sulfaciclinas, betalactámicos, salud pública, tiras reactivas, TRISENSOR®.

ABSTRACT

The sale of raw goat's milk has become a regular activity in several locations around the south of the Metropolitan District of Quito.

Every morning, people go out looking for this product. They believe that the milk has healing properties for respiratory diseases and fortifies the immune system.

In this investigation the objective was to identify the presence of antibiotics in this milk and the frequency of appearance, 90 samples of raw goat milk were collected; they came from several goats from the south of Quito. Through the use of the TRISENSOR® test kit, the presence of antibiotic residues was identified in the milk, which was destined for human consumption.

As a result, the frequencies of appearance obtained of the different types of antibiotic were: 93,33% (n=14) positives to beta lactams; 6,66% (n=1) positives to tetracycline; and 0% to sulfacycline.

In conclusion, it was possible to demonstrate that the percentages of antibiotics present in the goat's milk are high and this problem not only occurs nationally but also worldwide. The results were compared with similar studies in dairy productions from different countries, such as: Spain, Mexico, Colombia, Nicaragua and El Salvador, giving all a positive outcome to antibiotic traces, which turns this into a public health problem.

Key words:

Raw milk, goat, lacteal, Quito, traces, residues, antibiotics, tetracycline sulfacycline, beta lactams, public health, reactive strips, TRISENSOR®.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Problema.....	2
1.3 Objetivos	3
1.3.1. Objetivo General	3
1.3.2. Objetivos Específicos	3
1.4 Hipótesis:	4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	5
2.1 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria de la cabra	5
2.2 Características y composición de la leche de cabra	6
2.3 Bacterias no patógenas que se encuentran en la leche de cabra .	7
2.4 Importancia en la salud pública.....	8
2.5 Pruebas de detección de antibióticos.....	10
2.5.1 Prueba SNAP® Betalactámico, tetraciclina y gentamicina ST ..	10
2.5.2 Penzym	11
2.5.3 Beta Star	11
2.6 Prueba TRISENSOR® y mecanismo de reacción.....	12
2.7 Medios de cultivos bacterianos	13
2.7.1 Agar sangre.....	13
2.7.2 Agar chocolate	14
2.7.3 Agar MacConkey.....	15
2.7.4 Agar manitol	15
2.7.5 Agar Müller-Hinton	16
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Unidad de estudio de la investigación	17

4.1	Población y muestra.....	18
3.3	Materiales.....	18
3.3.1	Material utilizado en campo:.....	18
3.3.2	Material de laboratorio:.....	18
3.4	Métodos	23
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		26
4.1	Resultados	26
4.2	Identificación de antibióticos en la leche	26
4.3	Análisis de muestras por antibiótico	28
4.3.1	Ampicilina	28
4.3.2	Amoxicilina + Clavulanato	28
4.3.3	Cefalotina	29
4.3.4	Cefalexina	29
4.3.5	Doxiciclina	30
4.3.6	Oxaciclina	30
4.3.7	Penicilina.....	31
4.3.8	Tetraciclina	31
4.3.9	Trimetoprim + Sulfametoxasole.....	32
4.4	Discusión.....	32
4.5	Limitaciones	37
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		38
5.1.	Conclusiones.....	38
5.2.	Recomendaciones.....	39
REFERENCIAS.....		40
ANEXOS.....		44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Motivos de consumo de leche cruda de cabra. Adaptada de Malaver, 2016.	3
Figura 2. Prueba SNAP para detectar residuos de antibióticos. Adaptado de IDEXX, 2017.	10
Figura 3. Interpretación de resultados de prueba Beta Star. Adaptado de CHR HANSEN, 2009.	12
Figura 4. Interpretación visual del Kit analítico TRISENSOR®.....	13
Figura 5. Metodología ejecutada para la obtención de muestras de leche.	23
Figura 6. Procesamiento de muestras dentro del laboratorio.	24
Figura 7. Procesamiento realizado para los cultivos bacterianos.	25
Figura 8. Resultado del procesamiento de las 90 muestras.	26
Figura 9. Comparación de resistencia y sensibilidad ante diferentes antibióticos.	27
Figura 10. Resultados de antibiograma con ampicilina.....	28
Figura 11. Resultados de antibiograma con amoxicilina + clavulanato.....	28
Figura 12. Resultados de antibiograma con cefalotina.	29
Figura 13. Resultados de antibiograma con cefalexina.	29
Figura 14. Resultados de antibiograma con doxiciclina.....	30
Figura 15. Resultados de antibiograma con oxaciclina.....	30
Figura 16. Resultados de antibiograma con penicilina.....	31
Figura 17. Resultados de antibiograma con tetraciclina.	31
Figura 18. Resultados de antibiograma con trimetoprim + sulfametoxasole....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Comparación de componentes entre leche de 3 especies.	7
Tabla 2 Cantidades permitidas de trazas de antibióticos en leche.	9

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La cabra se ha considerado como una de las especies de animales domésticos con mayor aprovechamiento sobre todo por su leche, carne y piel (Lara y Ortega, 2012). Además es un animal reconocido por su gran rusticidad, adaptabilidad y por ser productivo en ambientes poco favorables.

La leche de cabra y sus derivados son alimentos consumidos alrededor del mundo ya que aportan nutrientes fácilmente accesibles para el ser humano, esto ha formado tradiciones en diferentes culturas alrededor del mundo para que sean productos de consumo cotidiano (Lara y Ortega, 2012).

“Se calcula que la población de cabras en el mundo es de aproximadamente 700 millones de cabezas, de las cuales sólo el 5% se encuentra en Latinoamérica (35 millones)” (Lara y Ortega, 2012).

En el informe ejecutivo realizado por el INEC de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2016 se menciona que la población caprina en el Ecuador ha sido estimada en 36 mil cabezas, considerándose uno de los valores más bajos en comparación al ganado vacuno (4,13 millones de cabezas) y al ganado ovino (478 mil cabezas) (INEC, 2016).

En la provincia de Pichincha hasta el año 2015 el INEC en la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua muestra la existencia 1.676 cabezas de ganado caprino (INEC 2015).

1.2 Problema

En el Distrito Metropolitano de Quito a tempranas horas de la mañana se puede observar cabras que caminan por diversas calles ubicadas al sur de la ciudad. Desde hace algunos años atrás se expende un producto proveniente de estos animales ya sea por tradición, costumbre o en su gran parte creencia popular las personas salen a tempranas horas de las mañanas en busca de un vaso de leche (Diario El Comercio, 2012).

Este producto tiene un costo bajo por lo que la hace accesible, la leche es consumida popularmente por adultos, ancianos, niños, madres gestantes e incluso personas con alguna dolencia o afección respiratoria en su mayoría. Los consumidores afirman que esta leche cruda de cabra cura diferentes problemas como el asma, gripe, resfríos o enfermedades respiratorias y además ayuda a mejorar el sistema inmune (Diario El Comercio, 2012).

Asimismo al tratarse de un comercio informal esta producción no está regulada por normas sanitarias lo cual implica un alto riesgo al ser ingerida (Zabala, 2013).

Hay que tomar en cuenta que al ser un comercio ambulante la metodología utilizada durante el ordeño no es el más óptimo. El tipo de ordeño que se realiza en estos animales es manual en el cual no hay una limpieza de la ubre antes y después del ordeño. (Diario El Comercio, 2012).

En diversas encuestas realizadas por Malaver (2016), para la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Universidad de las Américas, demostró que las personas consumían esta leche por diferentes motivos. (Ver figura 1).

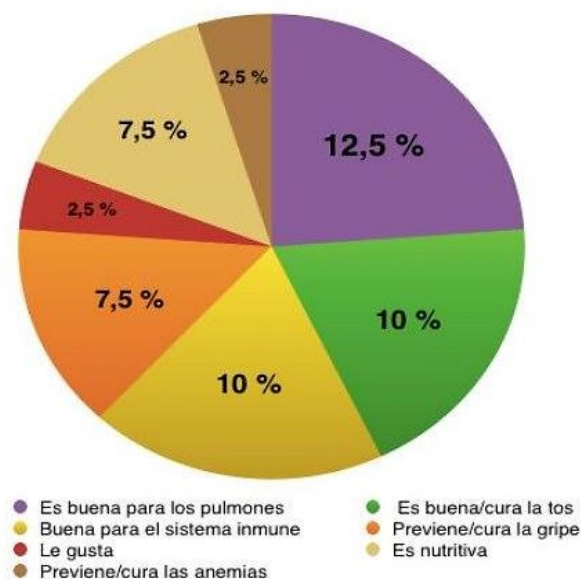


Figura 1. Motivos de consumo de leche cruda de cabra. Adaptada de Malaver, 2016.

En un estudio realizado por Zabala en el 2013 y en otro por Malaver en el 2016 demostraron que la leche de cabra no es segura para ser consumida por humanos, aún más si este producto no está pasteurizado o hervido.

1.3 Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Identificar la existencia de trazas de antibióticos en leche cruda de cabra que es consumida en las calles del Distrito Metropolitano de Quito.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Identificar la presencia de los tres tipos de antibióticos (tetraciclina, sulfaciclina y betalactámicos) en la leche cruda de

cabra que se consume en el sur del Distrito Metropolitano de Quito a través de cintas reactivas.

- Analizar la frecuencia de aparición de las diferentes familias de antibióticos (tetraciclina, sulfaciclina y betalactámicos) en las muestras de leche cruda de cabra.

1.4 Hipótesis:

Existen trazas de antibióticos en la leche de cabra que se consume por la población en el sur del Distrito Metropolitano de Quito.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria de la cabra

La glándula mamaria caprina anatómicamente y fisiológicamente es muy similar a la bovina. En cuanto a estructura anatómica la vaca tiene 4 glándulas mamarias ubicadas en la región inguinal, y cada uno de estas 4 unidades son totalmente independientes conformadas por una estructura secretora que se comunica al exterior mediante el pezón (Senger, 2005) a diferencia la cabra posee solo 2 glándulas mamarias ubicadas en la misma región.

El ectodermo del embrión es el origen de las glándulas mamarias. El ectodermo mamario al principio está representado por engrosamientos paralelos lineales en la pared ventral del abdomen. La continuidad de la cresta formada se rompe en un número determinado de brotes mamarios, a partir de los cuales se desarrolla la parte funcional de la mama (Klein, 2014).

El parénquima o células secretoras de leche se desarrollan por la proliferación de células epiteliales procedentes del cordón mamario primario. Con el tiempo, estas células forman unas estructuras circulares profundas denominadas alveolos, que constituyen las unidades fundamentales de secreción de leche en la glándula mamaria (Klein, 2014). Cada alveolo presenta irrigación compuesta por vénulas y capilares pequeños. Cada grupo de alveolos formará un racimo que será un lobulillo. Y cada uno de estos lobulillos estará integrando un lóbulo que más adelante desembocará en un conducto mayor rodeado de tejido conjuntivo. De manera general, de cada alveolo saldrá un conducto lactífero, el cual se van denominando de distinta manera acorde a como se vayan situando (intra lobulillares, interlobulillares, intra lobulares, interlobulares), de la confluencia de estos se formarán en cada cuarto, los conductos galactóforos avanzarán a la cisterna de la leche, estructurado por paredes muy elásticos que podrán almacenar cantidades de leche. Esta cisterna glandular continuará

en el seno de pezón, el cual seguirá al exterior por el conducto papilar, separados por unos pliegues de la mucosa denominada roseta de furstenberg que en conjunto con el esfínter papilar evitarán la salida pasiva de la leche, además de servir de protección para cuerpos extraños y gérmenes (Callejo, sf). Klein en el 2014 señala que una de las mejores adaptaciones anatómicas de la ubre que permite almacenar grandes cantidades de leche es el desarrollo de un sistema de suspensión, formado por el ligamento suspensorio interno.

La eyección de leche sigue un mecanismo iniciado por la succión. Cada pezón contiene una serie de neuronas sensoriales, las cuales por medio de un estímulo llevan información aferente hacia los nervios del núcleo ventricular y hacia el lóbulo posterior de la pituitaria que liberará la hormona oxitocina, la cual viaja por la sangre hacia la glándula mamaria. Las células diana de oxitocina llamadas células mioepiteliales permitirán que mediante la contracción de estas células liberen la leche en cada alveolo dentro de los pequeños ductos para después continuar por el conducto largo. El efecto constante de la estimulación de las células mioepiteliales a través de la glándula mamaria entregará la leche a los largos ductos y a la cisterna glandular, estando disponible para el ordeño o para la lactancia (Senger, 2005).

2.2 Características y composición de la leche de cabra

En cuanto a composición de la leche de cabra no existen diferencias significativas con la leche de vaca, como se puede apreciar en el siguiente cuadro comparativo de la leche de cabra, oveja y de vaca (Ver tabla 1)(Ferrando & Boza, 1990).

Tabla 1

Comparación de componentes entre leche de 3 especies.

Componente	Cabra	Vaca	Oveja
Grasa (g)	4,5	3,7	7,4
Magnesio (mg)	0,018	0,003	11
Calcio (mg)	134	133	183
Hierro (mg)	0,05	0,03	0,07
Fosforo (mg)	111	92	0
Sodio (mg)	50	60	30
Lípidos totales (%)	4,14	3,34	3,1
Colesterol (mg)	11	10	11
Energía (kJ)	288	257	96,7
Carbohidratos (%)	4,45	4,5	4,7
Lactosa (g)	3,8	4,9	7,9
Vitamina E (mg)	0,07	0,06	0
Vitamina D (UI)	12000	40431	38000
Vitamina A (UI)	185	126	170
Proteína total (%)	3,56	3,29	6,2
Vitamina B6 (mg)	0,005	0,04	0,08
Casienas (g)	3,49	2,8	4,2
Nitrógeno no proteico (%)	0,4	0,2	0,8

Tomado de: Chacón, 2005; Bedoya, Rosero y Posada, 2016; Ochoa, Vega, Ochoa, Bisset y Torres, 2009 y Gómez, 2010.

2.3 Bacterias no patógenas que se encuentran en la leche de cabra

En la leche de cabra existen microorganismos que son deseables y que cumplen funciones como dar textura a la leche, dar sabor, aroma y condiciones óptimas para la elaboración de productos lácteos. Además ciertas bacterias no patógenas ayudan a la conservación de la leche, prolongan la vida de los productos lácteos y contribuyen a provocar efectos probióticos, es decir, mejoran el tracto gastrointestinal de los humanos y estimulan el sistema inmunológico (Alais, 1985 y Heer, 2007).

Algunos de estos microorganismos no patógenos encontrados en la leche son: *Propionibacterium shermanii*, *Leuconostoc* sp. *Streptococcus paracitrovorus* (Revilla, 1996). *Lactococcus lactis*, *Enterococcus*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus* y *Carnobacterium divergens*

(Martín del Campo, Gómez y Alaníz, 2008). *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Salmonella* sp., *Pseudomona* sp. y *E. coli* (Alais, 1985 y Heer, 2007).

2.4 Importancia en la salud pública

La resistencia a los antibióticos se da por ciertas características específicas de determinadas bacterias que impiden ser dañadas por ciertos principios activos, a esto se refiere la resistencia intrínseca (Lázaro y Oteo, 2006). En cambio la resistencia adquirida ha sido descrita como aquella que “mediante la cual una bacteria previamente sensible a un antibiótico puede obtener o desarrollar mecanismos adaptativos que le permitan sobrevivir en su presencia” (Lázaro y Oteo, 2006).

“Los residuos o inhibidores en leche han sido definidos como toda sustancia química o biológica, que al ser administrada o consumida por el animal, se elimina y/o permanece como metabolito en la leche(...), con efectos nocivos para el consumidor” (Máttar, Calderón, Sotelo, Sierra y Tordecilla, 2009).

En la actualidad los resultados del uso o ingesta no controlada de antibióticos, dosis terapéuticas mayores o menor a las permitidas por peso y tratamientos más largos o muy cortos han tenido consecuencias no deseables en el humano como infecciones bacterianas más difíciles de tratar generando patologías graves y de periodos de tiempo prolongados, períodos de contagio mayores, efectos secundarios a medicamentos e ingresos hospitalarios más extendidos (Lázaro y Oteo, 2006).

Actualmente en el ámbito veterinario la principal causa de aparición de cepas resistentes se debe al uso excesivo de antimicrobianos, sustancias administradas a los animales con el propósito de realizar profilaxis, tratamientos terapéuticos y promotores de crecimiento de los animales (Máttar, Calderón, Sotelo, Sierra y Tordecilla, 2009).

Existen tratamientos profilácticos que pueden causar grandes cantidades de residuos por períodos prolongados de tiempo, la aparición de antibióticos en leche puede desencadenar efectos no deseados en humanos y en crías provocando reacciones alérgicas, disbacteriosis, sobrecrecimientos, resistencias y algunos efectos tóxicos, también pueden producir alteración de la flora intestinal, desarrollo de microorganismos patógenos y reducción de la síntesis de vitaminas (Máttar, Calderón, Sotelo, Sierra y Tordecilla, 2009). El Codex Alimentarius es el órgano regulador que señala los parámetros y cantidades permitidas de trazas de antibióticos en leche. Por ejemplo: (Ver tabla 2).

Tabla 2

Cantidades permitidas de trazas de antibióticos en leche.

ANTIBIÓTICO	TEJIDO	LMR
Gentamicina	Leche	200 µg/kg
Dihidroxiestreptomicina/ Estreptomicina	Leche	200 µg/kg
Neomicina	Leche	1500 µg/kg
Paromomicina	Leche	---
Amoxicilina (β-lactámicos)	Leche	4 µg/kg
Sulfadimidina (Sulfamidas)	Leche	25 µg/kg
Tetraciclinas	Leche	---

Tomado de: Codex Alimentarius, 2015.

2.5 Pruebas de detección de antibióticos

2.5.1 Prueba SNAP® Betalactámico, tetraciclina y gentamicina ST

La prueba incorporada por IDEXX para detectar residuos betalactámicos, tetraciclinas y gentamicina es una manera fácil de usar, la cual detecta concentraciones iguales o inferiores de los residuos. La manera de usarlo es mediante la recolección de una muestra de leche mediante pipeta 400uL y se añade la cantidad medida en el recipiente con el conjugado y se agita bien para disolver la pastilla en ella contenida. Después se reposa la muestra durante 15 segundos y se coloca en el pocillo del SNAP, mientras el borde del círculo de activación desaparece, se presionará la parte que sobresale del SNAP. Finalmente se cronometra 6 minutos, procedimiento efectivo para betalactámicos (IDEXX, 2017).

Por otro lado para detección de tetraciclina y gentamicina, se tendrá que calentar en incubadora el dispositivo SNAP, luego de pasados unos minutos se mezclará el conjugado con la leche y finalmente se seguirá los pasos antes mencionados, presionar el botón de activación y esperar a que se coloree el botón. Para la lectura en las tres pruebas, solo detecta los colores ya formados, en el cual tiene en el lado 1 el control y en el 2 la muestra. Si se diera el caso de que la muestra estuviese igual o más oscura que el punto de control el resultado arroja que no hay detección de residuos. Pero si la muestra es más clara que el punto de control, la prueba tendrá un resultado de haber detectado residuos antibióticos (IDEXX, 2017) (Ver figura 2).



Figura 2. Prueba SNAP para detectar residuos de antibióticos. Adaptado de IDEXX, 2017.

2.5.2 Penzym

Es un método rápido de detección de betalactámicos en leche. Cuya buena sensibilidad hace de este test una alternativa a usarse. El fundamento de esta prueba es la inhibición de la enzima carboxipeptidasa por antibióticos betalactámicos. Para la práctica es necesaria la muestra de leche incubada con la enzima mencionada. La carboxipeptidasa libre se analiza mediante incubación de la muestra con un sustrato sintético: N-acetil-L-lisina-D-alanina-D-alanina y con D-aminoácido oxidasa, flavina adenina dinucleótido (FAD), peroxidasa y una cromógeno. La carboxipeptidasa separa el terminal D-alanina del sustrato y la D-aminoácido oxidasa, después oxida la D-alanina al ácido pirúvico con el efecto de producción de peróxido de hidrógeno y amoníaco. A la presencia de peroxidasa, el cromógeno oxida el peróxido de hidrógeno obteniendo una coloración distinta al rosa. Es decir que, en ausencia de sustancias inhibidoras, el color rosa aumenta su intensidad y a medida que aumenta la concentración de antibiótico el color disminuye (Thorogood y Ray, 1994).

2.5.3 Beta Star

Es un test de detección de antibióticos betalactámicos y cefalosporinas. La prueba se fundamenta en un receptor betalactámico y una proteína que se une a partículas de oro. Para el procedimiento se debe agregar leche a un vial más una cantidad específica del receptor que reaccionará con la presencia de un betalactámico cualquiera que este sea. En el siguiente paso, el medio que se haya incubado migrará hacia arriba de la tira en contacto con este. La línea inferior de esta tira atrapará a los receptores que no se ligaron a ningún antibiótico durante la primera incubación de la mezcla. La segunda línea sirve como control. Cuando en la leche no detecta antibióticos betalactámicos la línea de prueba inferior mostrará una banda roja más oscura que la de control, entonces será negativa. En cambio, si hay una línea más clara indica que las

proteínas de unión han sido completas o parcialmente bloqueadas por antibióticos presentes en la leche, lo cual resulta en una prueba positiva. Si la línea superior está ausente el test es inválido (CHR HANSEN, 2009) (Ver figura 3).

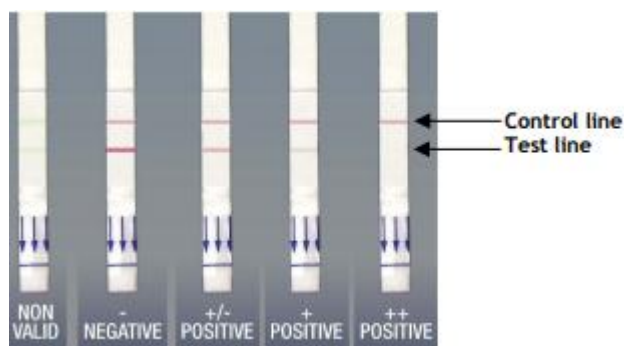


Figura 3. Interpretación de resultados de prueba Beta Star. Adaptado de CHR HANSEN, 2009.

2.6 Prueba TRISENSOR® y mecanismo de reacción

Es una prueba rápida que permite detectar simultáneamente la presencia de antibióticos tanto de betalactámicos y sulfacilinas como de tetraciclinas en una muestra de leche.

Esta consiste en ser una prueba comparativa atrayente que incluye dos receptores y anticuerpos genéricamente monoclonales en una sola operación. La prueba requiere la utilización de dos componentes:

El primer componente es un micro pocillo que contiene cantidades previamente determinadas de ambos receptores y anticuerpos enlazados con partículas de oro. El segundo componente consiste de una tira indicadora constituida por un conjunto de membranas con líneas de captura específicas.

Para que la prueba sea válida, la línea roja de control tiene que ser visible al final de la segunda incubación. Las otras tres son las líneas de prueba específicas que se encuentran debajo de la línea de control. Cuando el reactivo del

micropocillo se vuelve a poner en suspensión con una prueba de leche, si estuvieran presentes, ambos receptores se enlazarán con los analitos correspondientes durante los tres primeros minutos de incubación a 40 °C.

A continuación, cuando la tira indicadora se sumerge la leche, el líquido comienza recorrer verticalmente la tira indicadora y pasa a través de las ondas de captura. Cuando la muestra no contiene antibióticos, se procede a un revelado de color en las líneas de captura específicas, indicando la ausencia de los analitos buscados en la muestra de leche. Por el contrario, la presencia de antibióticos en la muestra no provocará el surgimiento de la señal de color en las líneas de captura específicas (Ver figura 4).

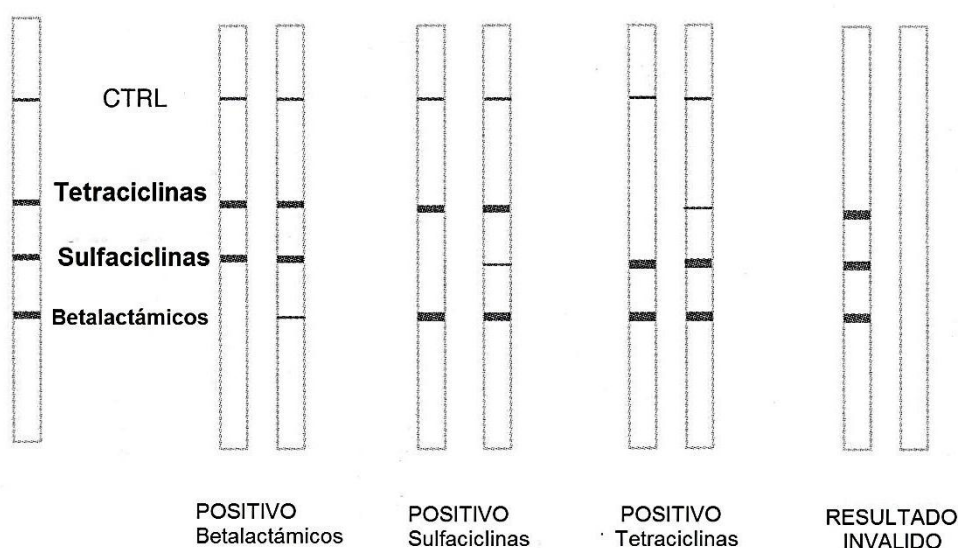


Figura 4. Interpretación visual del Kit analítico TRISENSOR®.

2.7 Medios de cultivos bacterianos

2.7.1 Agar sangre

Este tipo de agar es considerado medio natural y es sólido, es utilizado para realizar cultivos y aislamiento de microorganismos anaerobios nutricionalmente exigentes y aerobios, especialmente para el crecimiento de *Streptococcus*. Sirve también para observar y determinar reacciones de hemólisis, no obstante

la reacción de ciertos microorganismos puede ser distinta según el tipo de sangre que se utiliza. Como se ve en el caso de los de algunas cepas de estreptococos grupo D, las cuales son clasificadas erróneamente como grupo A. Este tipo de agar también es usado como base para la obtención de otros agares. Por lo tanto este tipo de agar es diferencial y ayuda a observar los tipos de hemólisis (MDM Científica, 2013).

Su fundamento se basa en que aporta nutrientes favorables para el crecimiento bacteriano y de este modo se manifiesta la hemólisis. La fibrina es la responsable de la estimulación de la coagulación de la sangre, por otro lado está libre de agentes que puedan interferir con el desarrollo microbiano. Se utiliza sangre de carnero, caballo u otras especies porque estas están libres de factores inmunológicos que puedan interferir con los resultados, como es el caso de la sangre humana (MDM Científica, 2013).

Lo que se observa son los halos hemolíticos alrededor de las colonias microbianas, para de este modo establecer el tipo de hemólisis presente; en el caso de alfa se ven halos verdosos, en gamma hay inexistencia de halos y en beta son halos incoloros (MDM Científica, 2013).

2.7.2 Agar chocolate

El agar chocolate es un medio de cultivo que contiene hemoglobina proveniente de bovinos, lo cual sirve para observar el crecimiento de toda clase de microorganismos que sean de crecimiento rápido, asimismo microorganismos de crecimiento exigente que necesite factor X para su crecimiento, tales como: *Neisseria*, *Haemophilus*, y *Listeria*. No es un método diferencial (Bio Bacter, 2015).

Este tipo de agar es un medio que permite el crecimiento y desarrollo de bacterias patógenas y saprófitas. Con ello, se debe aislar para poder identificar claramente. Hay que realizarlo de la manera más aséptica posible para evitar

contaminación cruzada con otros microorganismos que produzcan un mal diagnóstico. Este agar es muy sensible a cambios bruscos de temperatura y movimientos fuertes. Por lo cual, debe ser conservado a 4 - 8°C y se coloca las cajas en posición invertida, pues se quiere evitar cualquier daño en la capa o superficie del medio (Bio Bacter, 2015).

2.7.3 Agar MacConkey

Este agar es un medio selectivo y diferencial, ya que proporciona las diferencias entre coliformes y no fermentadores de lactosa, aíslan inhibiendo bacilos gram negativos de fácil desarrollo. Por otro lado inhibe gram positivas, esto ocurre porque las sales biliares junto con el cristal violeta inhiben el crecimiento de estos. Así como la lactosa es la responsable de la diferenciación de las bacterias. En el caso de las enterobacterias fermentadoras de lactosa como: *Enterobacter*, *E. coli*, y *Klebsiella* se muestran de color rojo o rosado y violeta. Presentan un halo alrededor de las colonias y las no fermentadoras de lactosa como la *Providencia*, *Salmonella*, *Proteus* o *Shigella* se ven transparentes (Britania Lab, 2001).

2.7.4 Agar manitol

Este medio de cultivo selectivo y diferencial es utilizado tanto para aislamiento como para la diferenciación de *Staphylococcus*. Es un medio muy selectivo por la cantidad salina. Cuando hay presencia de estafilococos, las colonias se las percibe por una zona amarilla alrededor de ellas, estas son llamadas estafilococo coagulasa positivo. Por otro lado, los estafilococos coagulasa positivo se los percibe con una zona roja a púrpura alrededor de las colonias. Si hay presencia de bacterias se verá de color amarillo y habrá un cambio en el pH. El almacenamiento de las placas con este tipo de agar es similar a los anteriores, debe ser manipulado con cautela y se debe mantener a una temperatura entre 2 y 8 °C. Es principalmente utilizado para observar *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus*,

Enterococcus, *Micococcus*, y bacterias gram negativas en menor cantidad (Becton Dickinson, 2013).

2.7.5 Agar Müller-Hinton

Este tipo de agar es usado como medio de cultivo común para procesas pruebas de susceptibilidad de antibióticos. Este agar promueve el desarrollo microbiano, este tiene una alta reproductibilidad de pruebas de sensibilidad en los lotes de muestras con trimetoprima, sulfonamidas y en menos porcentaje tetraciclinas. Se utiliza para detectar microorganismos tales como: *Streptococcus spp.*, *Enterobacterias*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Escherichia coli*, entre otros. Hay que tener precaución con la temperatura al momento de la evaluación o estudio de las placas pues si es mayor a 35 grados, pueden no detectar cepas resistentes (Britania Lab, 2001).

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Unidad de estudio de la investigación

Esta investigación de campo se realizó en las zonas del sur del Distrito Metropolitano de Quito en diferentes barrios donde la venta ambulante de la leche de cabra es conocida y demandada por los pobladores. Los barrios donde se realizó la colecta de muestras fueron:

- Mercado Mayorista
- Barrio El Pintado
- Barrio La Ecuatoriana
- Sector Terminal de Quitumbe
- Loma de Puengasí
- Sector Chiriyacu
- Sector La Mena
- Av. Mariscal Sucre y Santiago
- Tribuna del Sur
- Sector La Jota
- Sector Moraspungo
- Calle Rafael Arteta y Calvas
- Escuela Fe y Alegría
- Av. Teniente Hugo Ortíz y Calle Agustín Aguinaga.

El sur del Distrito Metropolitano de Quito cuenta con una temperatura media anual que oscila entre 13,9 a 22° C, una precipitación de 1.273 milímetros al año (mm/año) y una altitud de 2.200 a 3.100 metros sobre el nivel del mar (msnm)(es-climate-data.org, 2015).

Las muestras obtenidas se procesaron en el Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador, el mismo donde se obtuvieron los resultados finales de la investigación.

4.1 Población y muestra.

La población en estudio fueron los animales caprinos, específicamente hembras lactantes que se encontraron por las calles de varios sectores del sur de Quito con los vendedores de leche. Se tomaron 90 muestras en un período de 4 semanas, estas fueron tomadas en horas de la mañana desde las 6 am cuando empezaba la venta del producto, las muestras fueron recolectadas, etiquetadas y procesadas debidamente en el Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador.

3.3 Materiales

3.3.1 Material utilizado en campo:

- Envases estériles para muestra de orina (recolección de leche)
- Hielo químico o gel frío
- Termo para mantener las muestras refrigeradas
- Marcador permanente negro para etiquetar las muestras marca Sharpie®
- Libreta de anotaciones
- Esferográfico
- Cámara fotográfica

3.3.2 Material de laboratorio:

- Guantes de latex talla xs
- Guantes de vinilo talla xs
- Guantes de caucho grueso
- Kit Trisensor®
 - 12 tubos herméticos cada uno con 1 serie de 8 reactivos microposillos y

8 tiras indicadoras. (Total 96)

- 1 micropipeta de 200 μ l

- 96 puntas estériles, desechables para micropipeta

- 1 estándar positivo que contiene polvo para reconstituir leche cruda.

- 1 estándar negativo que contiene polvo para reconstituir leche cruda.

- Refrigeradora para muestras
- Refrigeradora para reactivos
- Horno calentador
- Incubadora
- Microscopio
- Cronómetro
- Mesa de trabajo
- Cuaderno de anotaciones
- Esferográfico
- Marcador permanente negro marca Sharpie®
- Marcador permanente negro marca Faber Castell®
- Cámara fotográfica
- Bata para laboratorio
- Autoclave
- Desintómetro McFarland
- Cámara de flujo
- Cajas petri de vidrio con tapa
- Guantes de protección para el calor
- Matraces Erlenmeyer de 50, 100 y 125 ml

- Probeta de 200 y 500 ml
- Tubos de ensayo
- Tapones de caucho
- Tubos Eppendorf de 1500 μ l
- Gradilla metálica
- Gradilla plástica
- Balanza digital BOECO®
- Papel empaque
- Papel encerado
- Papel aluminio
- Cinta adhesiva
- Microondas
- Muestras de leche
- Mechero de gas
- Encendedor Bic®
- Agua destilada
- Agar Sangre Conda®
- Agar MacConkey Difco™
- Agar Mannitol Sal BBL™
- Agar Muller Hinton Difco™
- Agar TSI BBL™
- Agar SIM BBL™

- Agar Lisina Descarboxilasa Difco™
- Agar Citrato de Simmons Difco™
- Caldo urea
- Sangre de cordero
- Sangre de conejo
- Plasma de conejo
- Centrifuga
- Asa de siembra de platino
- Asa de siembra de punta recta
- Micropipeta
- Puntas estériles desechables para micropipeta
- Placas portaobjetos
- Torundas de algodón
- Papel desechable de limpieza
- Palillos de madera estériles
- Cristal violeta
- Yodo
- Alcohol cetona
- Safranina
- Agua
- Aceite de inmersión
- Pinza anatómica metálica

- Tijera
- Discos de antibióticos
 - Ampicilina. BBL™
 - Amoxicilina + Clavulanato. BBL™
 - Cefalotina. BBL™
 - Cefalexina. OXOID
 - Doxiciclina. OXOID
 - Oxacilina. OXOID
 - Penicilina. BBL™
 - Tetraciclina. BBL™
 - Trimetoprim + Sulfametoxasole. BBL™
- Agua oxigenada
- Solución de cloruro de sodio estéril
- Vortex GENIE®
- Tiras de test citocromo oxidasa
- Vaso de precipitación
- Hipoclorito de sodio al 2%
- Hisopos estériles
- Torundas con alcohol
- Frasco de vidrio para desechos
- Jabón anti-bacterial
- Alcohol desinfectante en gel
- Detergente

3.4 Métodos

En la figura 5 se expone la metodología ejecutada en campo en la presente investigación para la obtención de la muestra de leche cruda. En los anexos: 1 y 2 se observan algunos de los animales que fueron seleccionados para este estudio. Refiriéndome al anexo 3 se observa la forma de colecta de la muestra y finalmente el anexo 4 se muestra como se hace el traspaso de la muestra a un envase estéril.

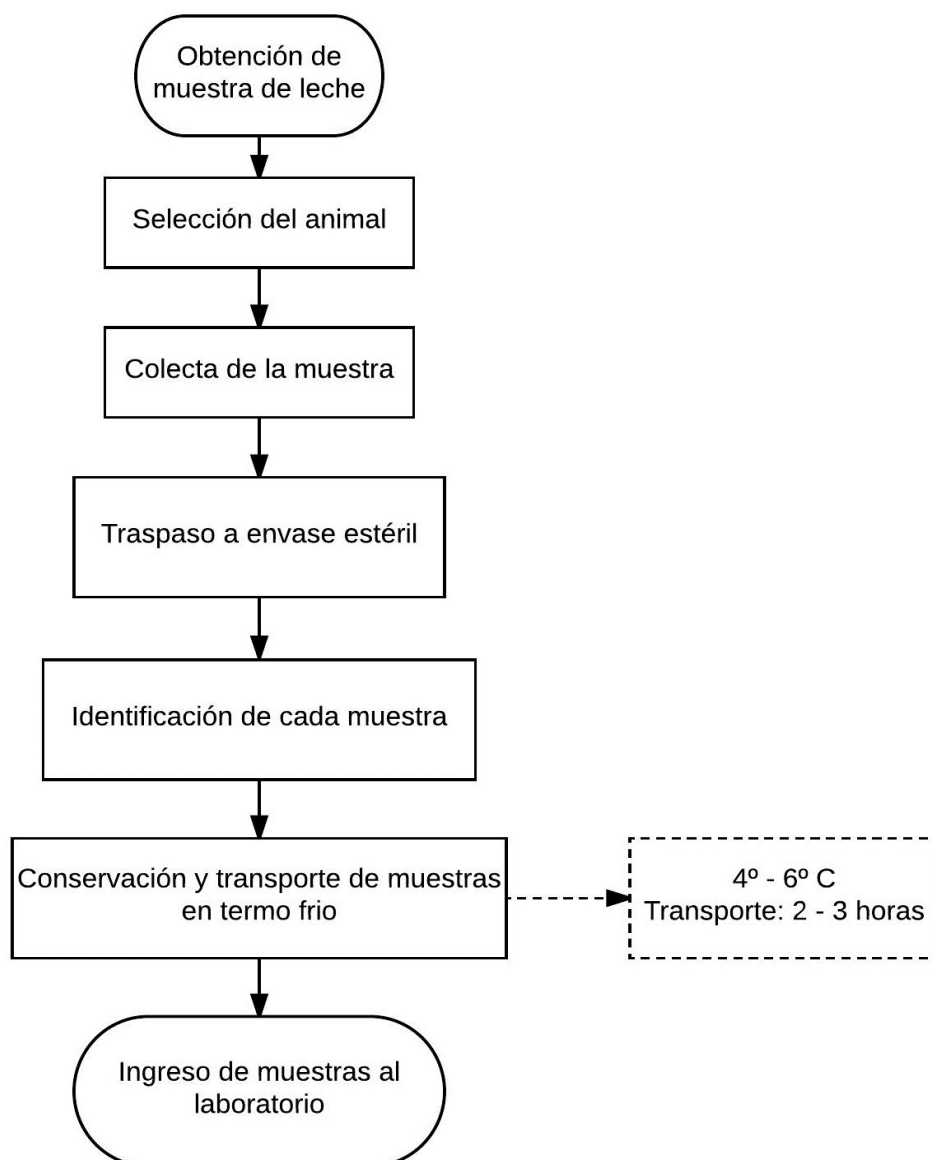


Figura 5. Metodología ejecutada para la obtención de muestras de leche.

En la figura 6 y anexos 5, 6, 7 y 8 se describen los pasos llevados a cabo durante la investigación para el procesamiento de las muestras dentro del Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Universidad Central del Ecuador.

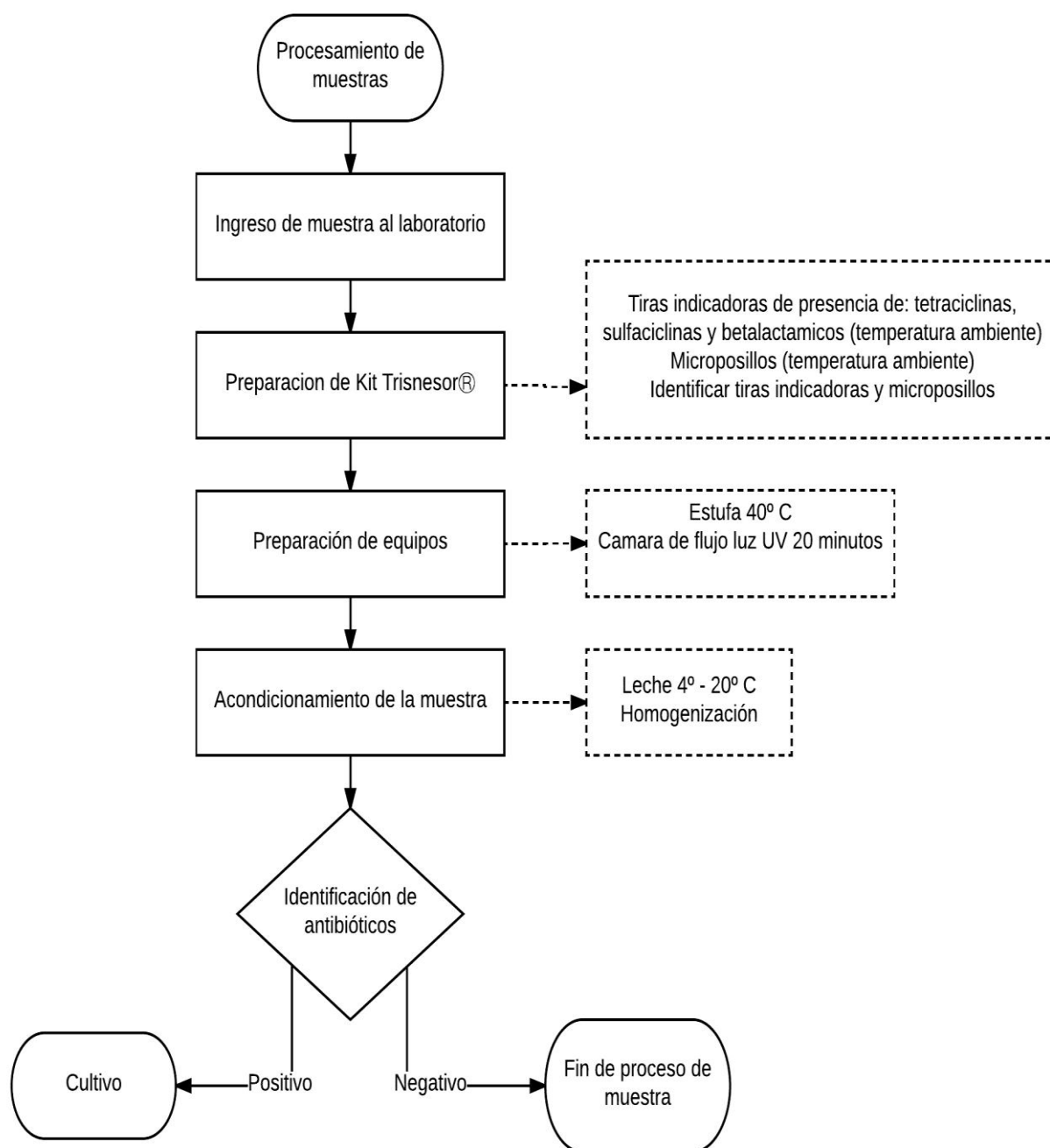


Figura 6. Procesamiento de muestras dentro del laboratorio.

En la figura 7 y anexos 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se muestran los procedimientos y detalles seguidos en la presente investigación con los cultivos bacterianos en el Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Universidad Central del Ecuador

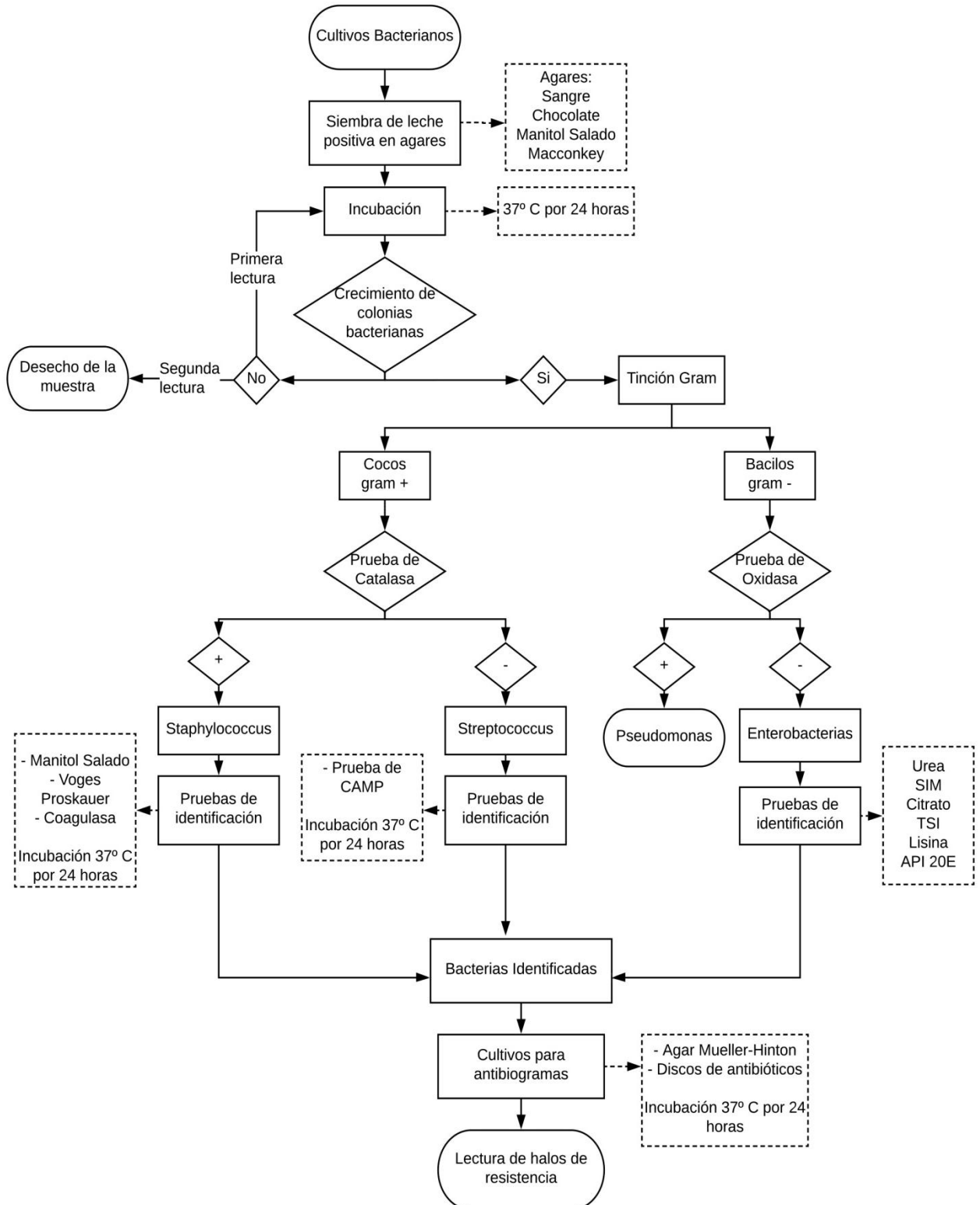


Figura 7. Procesamiento realizado para los cultivos bacterianos.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

Los resultados obtenidos en esta investigación corresponden al análisis de 90 muestras de leche cruda de cabra provenientes de distintos animales situados en diferentes barrios del sur del DMQ pertenecientes a múltiples productores en un periodo de tiempo de 4 semanas.

4.2 Identificación de antibióticos en la leche

De las 90 muestras procesadas en el Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Universidad Central del Ecuador el 16,67% (n=15) de las muestras reaccionaron positivas a las tiras reactivas, es decir conteniendo residuos de antibióticos. De estas 15 muestras positivas, el 93,33% (n=14) fueron positivos a betalactámicos y solo el 6,66% (n=1) positivo a tetraciclinas (Ver figura 8).

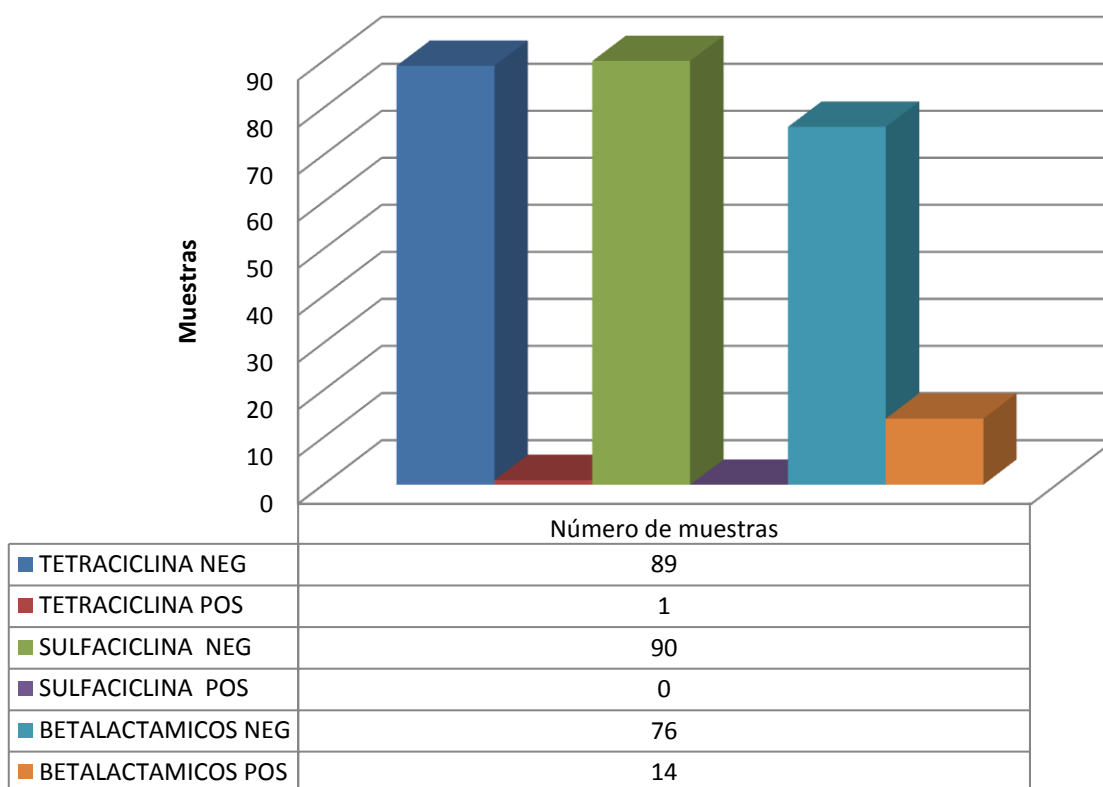


Figura 8. Resultado del procesamiento de las 90 muestras.

Obteniendo 15 muestras positivas para antibióticos se realizó cultivos de cada uno en diferentes medios selectivos como: agar sangre, agar chocolate, agar manitol salado y agar macconkey, obteniendo 11 muestras que presentaron crecimiento de colonias bacterianas; en estas muestras se identificó el género y realizó un antibiograma en agar Mueller-Hinton aplicando 9 antibióticos de diferentes familias.

Como se observa en la figura 9 las 11 muestras sometidas al antibiograma muestran diferentes resistencias, valoradas mediante halos de inhibición.

La oxaciclina es el primer antibiótico con el cual se observa el mayor número de resistencias, es decir el 63,64% (n=7) de las muestras presentaron halos con diámetros superiores a los rangos permitidos por este antibiótico. Los siguientes antibióticos con más número de muestras resistentes fueron: ampicilina, cefalexina y penicilina mostrando cada uno el 36,4% (n=4) de resistencia bacteriana.

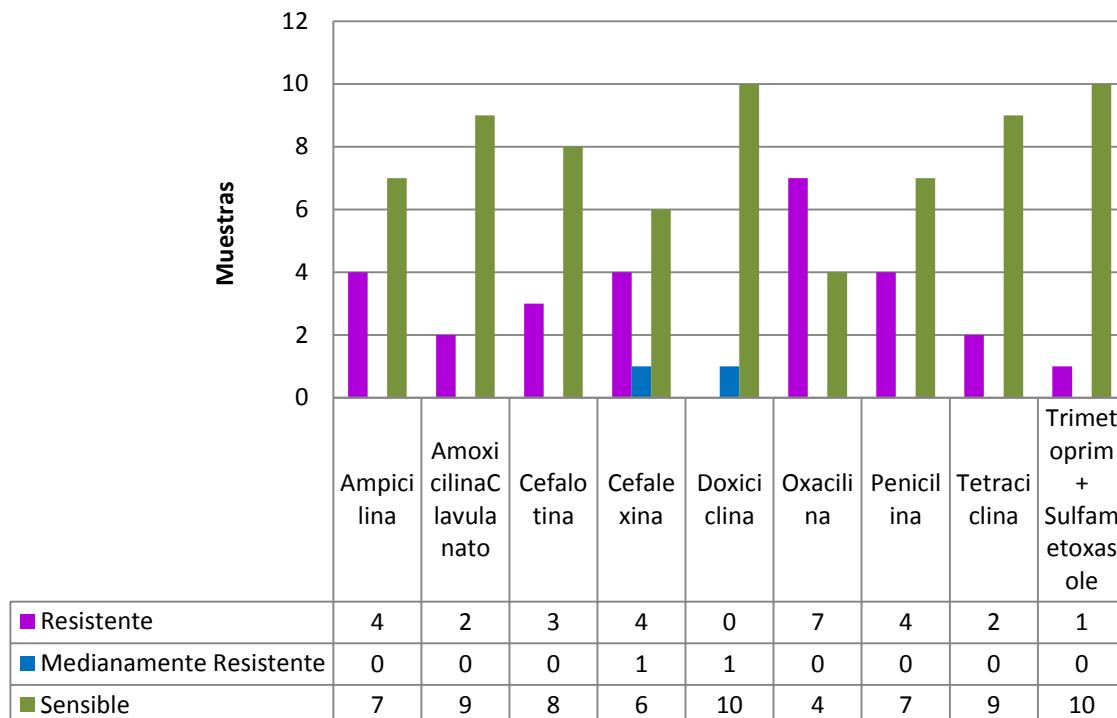


Figura 9. Comparación de resistencia y sensibilidad ante diferentes antibióticos.

4.3 Análisis de muestras por antibiótico

4.3.1 Ampicilina

Como se observa en la figura 10 el 36,4% (n=4) muestran resistencia a este antibiótico.

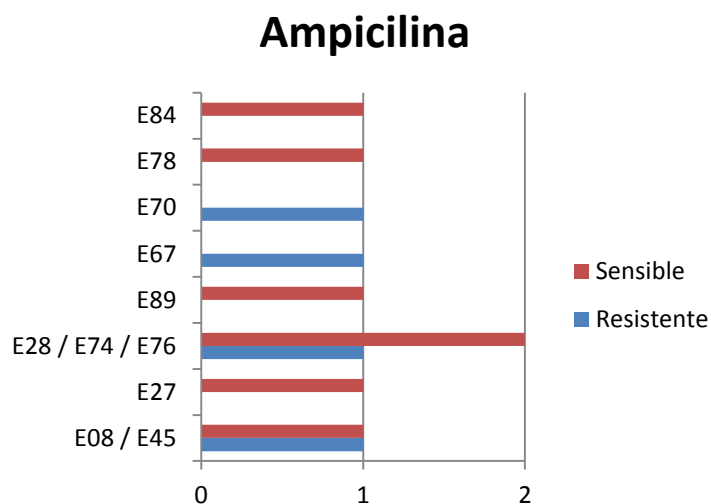


Figura 10. Resultados de antibiograma con ampicilina.

4.3.2 Amoxicilina + Clavulanato

Como se puede observar en la figura 11 el 18,2% (n=2) de las bacterias muestran resistencia a este antibiótico.

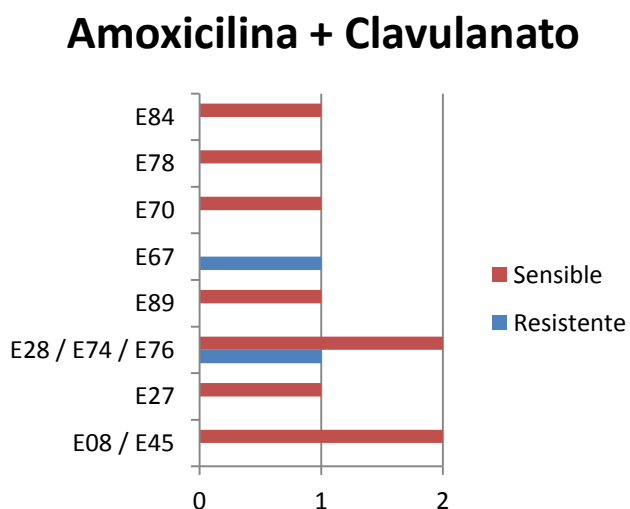


Figura 11. Resultados de antibiograma con amoxicilina + clavulanato.

4.3.3 Cefalotina

Observando la figura 12 se muestra que el 18,2% (n=2) de bacterias son resistentes a este antibiótico.

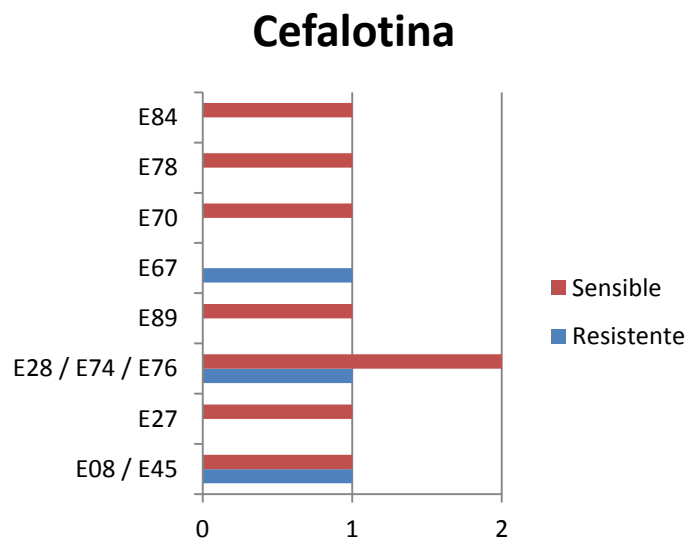


Figura 12. Resultados de antibiograma con cefalotina.

4.3.4 Cefalexina

Como se observa en la figura 13 el 36,4% (n=4) de bacterias muestran resistencia y el 9,1% (n=1) es medianamente resistente a este antibiótico.

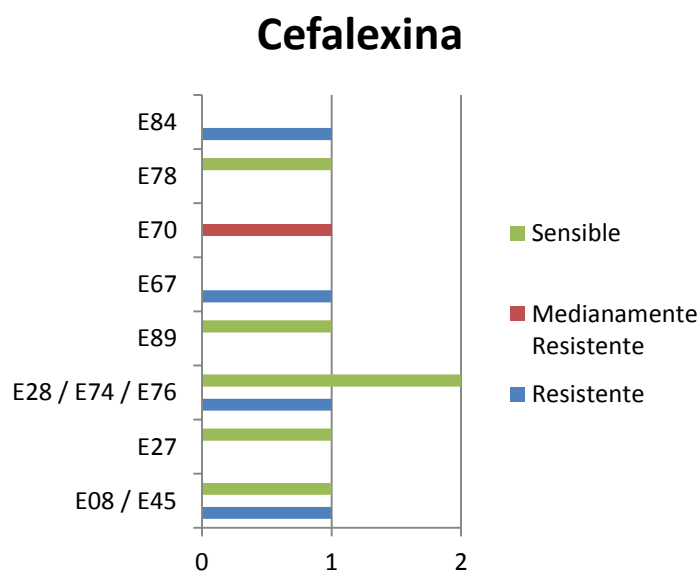


Figura 13. Resultados de antibiograma con cefalexina.

4.3.5 Doxiciclina

En la figura 14 se puede observar que solo el 9,1% (n=1) de bacterias resulta ser medianamente resistente a este antibiótico.

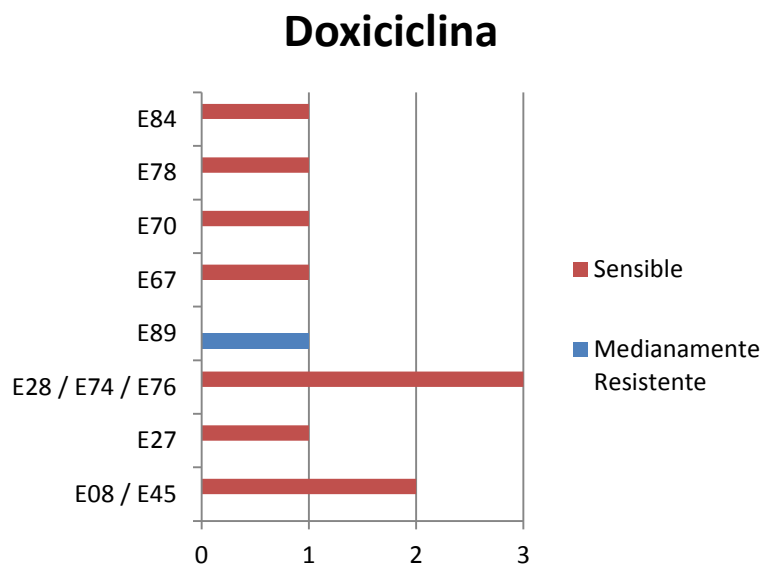


Figura 14. Resultados de antibiograma con doxiciclina.

4.3.6 Oxaciclina

Como muestra la figura 15 existe resistencia en el 63,64% (n=7) de bacterias ante este antibiótico

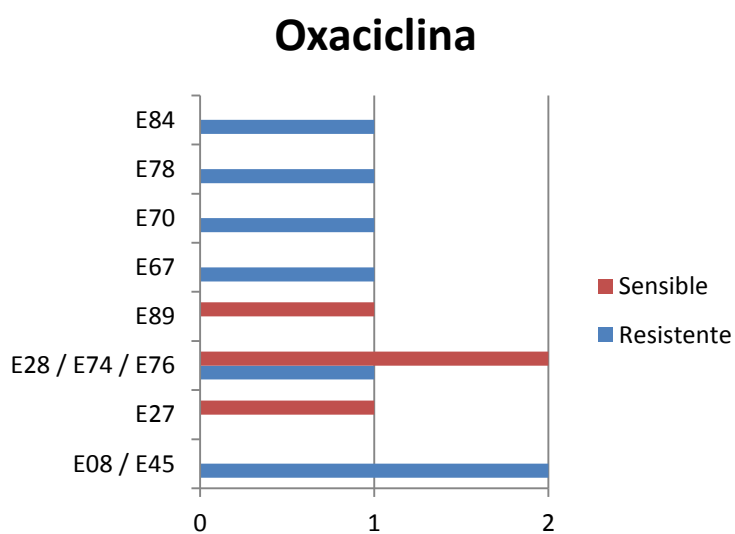


Figura 15. Resultados de antibiograma con oxaciclina.

4.3.7 Penicilina

Como se observa en la figura 16 el 36,4% (n=4) son resistentes a este medicamento.

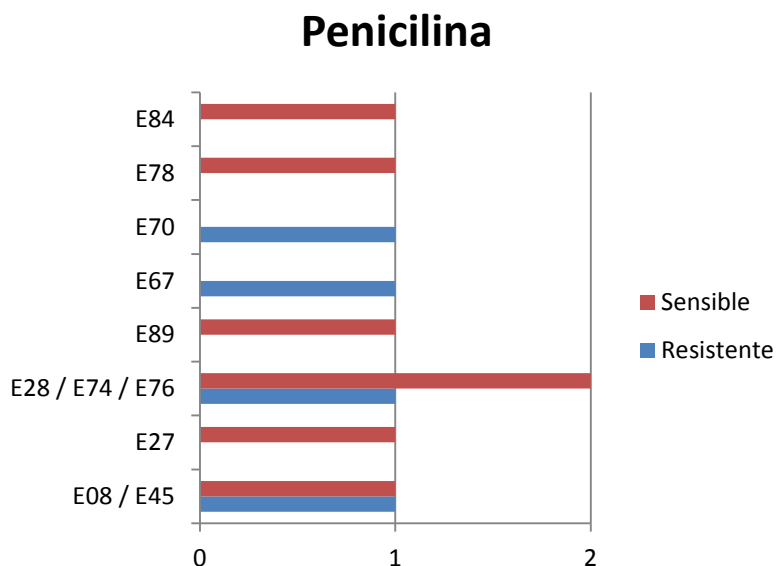


Figura 16. Resultados de antibiograma con penicilina.

4.3.8 Tetraciclina

En la figura 17 se puede observar que el 18,2% (n=2) de bacterias muestran resistencia a este antibiótico.

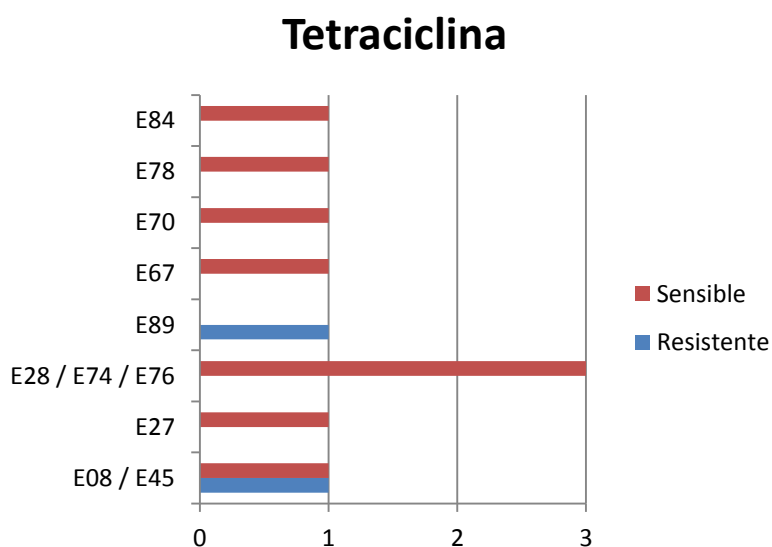


Figura 17. Resultados de antibiograma con tetraciclina.

4.3.9 Trimetoprim + Sulfametoxasole

Observando la figura 18 se muestra que solo el 9,1% (n=1) de bacterias son resistentes a este medicamento.

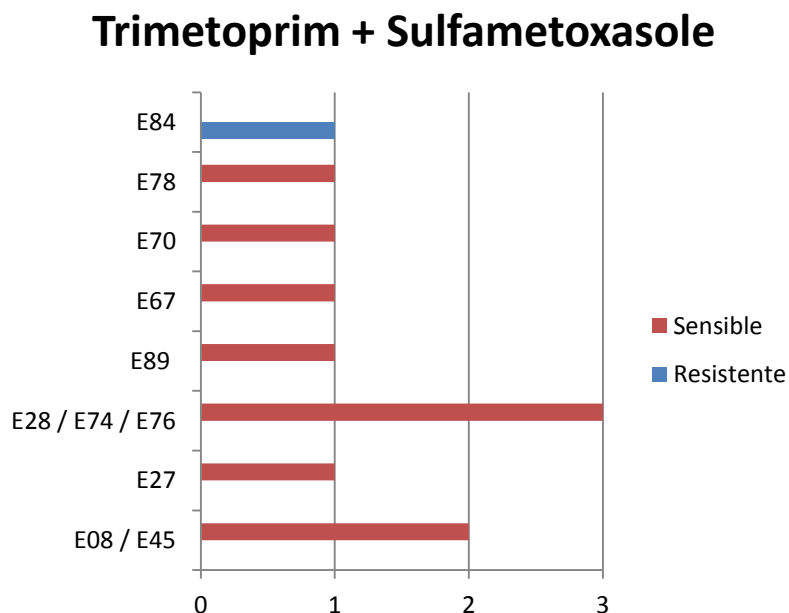


Figura 18. Resultados de antibiograma con trimetoprim + sulfametoxasole.

4.4 Discusión

En el presente estudio se observó la aparición de residuos de antibióticos en la leche cruda de cabra recolectada en el Distrito Metropolitano de Quito. A través de las tiras reactivas TRISENSOR® se detectaron 15 muestras positivas a antibióticos, de estas la mayoría fueron positivas a residuos de betalactámicos y una minoría a tetraciclinas.

En la investigación realizada por Máttar, Calderón, Sotelo, Sierra y Tordecilla (2009) en Montería – Colombia se determinó la presencia de antibiótico en leches crudas y procesadas en este municipio. En su investigación las unidades de estudio fueron animales de ganado bovino pues la leche obtenida de estos animales se considera un producto básico en la canasta familiar. Se obtuvieron 439 muestras y los resultados de esta investigación concluyeron

que en el 25,28% (n=111) existía presencia de antibióticos en la leche de vaca que se consumía por los pobladores de esta región y que además sobrepasaban los límites permitidos por el Ministerio de la Protección Social de Colombia.

En relación a la presente investigación se muestra que el 16,7% (n=15) de las muestras de leche de cabra poseen residuos de antibióticos que llegan a consumidores en las calles del Distrito Metropolitano de Quito. La diferencia entre el porcentaje proveniente del Municipio de Montería y el del Distrito Metropolitano de Quito se debe al tamaño de la población en estudio, en Montería se habla de 439 muestras siendo aproximadamente 4 veces más que el de Quito (n=90) por lo que es más usual la aparición de trazas de antibióticos.

En otro estudio realizado en la ciudad de México por Ramírez, Gutiérrez, González, Escobar, Castro, Díaz y Noa (2001) se encontró el 61% de muestras con presencia de antibióticos, la diferencia es que el método utilizado fue el de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) durante un período de 12 meses a diferencia de esta investigación que fue a través de tirillas reactivas en un periodo de tiempo de 4 semanas. En los resultados alcanzados por González *et al.* en México se obtuvo elevados porcentajes de antibióticos que aseguran se debían al amplio uso de antimicrobianos en el control de la mastitis del ganado lechero y por no cumplir con los tiempos de retiro adecuados para los medicamentos empleados en los animales.

En el año 2012 en El Salvador en una tesis realizada por Barrera y Ortez se puso a prueba la leche proveniente de 5 ganaderías bovinas junto con 2 marcas comerciales de leche distribuidas en el sector y todas resultaron tener trazas de antibiótico e incluso una de las leches comerciales mostró tener la mayor cantidad de trazas específicamente hablando de tetraciclina. Este mismo antibiótico fue encontrado en la presente investigación, pero a diferencia de que fue hallado en menor porcentaje (13,34%).

También se encontraron residuos de antibióticos en leche de ganado bovino destinada para consumo humano distribuida en 7 provincias diferentes ubicadas al sur de España. En un estudio realizado por Pozo, Herrera, Polo, López, Jodral e Iglesias (1977), se recolectó un total de 1346 muestras de las 7 provincias en estudio de las cuales el 1,2% de muestras (n=16) resultaron positivas a residuos de antibióticos, específicamente penicilina. Realizando una comparación con esta investigación realizada en leche de ganado caprino el 26,7% de las muestras (n=4) resultaron positivas al mismo antibiótico.

Además Pozo *et al.* indican que otro antibiótico muy utilizado en esta ganadería fue la estreptomina, presentando en el 1,1% de muestras (n=15) residuos del antibiótico ya mencionado. Conjuntamente se encontraron trazas de tetraciclina, otro antibiótico utilizado frecuentemente, los resultados para este antibiótico fue que el 1,04% de muestras presentaba residuos en la leche. En comparación con el presente estudio 13,34% (n=2) mostró tener residuos del mismo antibiótico.

En el año 2012 en un estudio realizado por Fernández en Valencia – España en leche cruda de cabras provenientes de la Universitat Politècnica de Valencia se aplicaron varias pruebas para determinar la existencia de antibiótico, una de ellas fue la prueba TwinSensor® que detecta betalactámicos y tetraciclinas. En comparación a la utilizada en este estudio fue la prueba TriSensor®, que detecta betalactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas, ambos test provienen de la misma compañía Unisensor creada en Bélgica.

Además en el mismo estudio realizado por Fernández *et al.* se analizó 12 antibióticos pertenecientes a diferentes familias, 9 betalactámicos y 3 tetraciclinas. Aquí se obtuvo como resultado muestras que contenían trazas de: ampicilina, amoxicilina, penicilina, cefalexina y tetraciclina. Estos mismos antibióticos se utilizaron en la presente investigación para realizar antibiogramas, donde las diferentes bacterias mostraron halos de inhibición

superiores a los parámetros establecidos por cada antibiótico, es decir resistencia ante los medicamentos ya mencionados.

Por otro lado se realizó un estudio por Rivera y Tórrez en el año 2012 en Nicaragua que se enfocó en identificar en leche cruda los agentes bacterianos causantes de mastitis subclínica en ganado bovino y se evaluó la resistencia de las bacterias aisladas ante fármacos que se usan para esta patología. Las bacterias encontradas fueron: *Staphylococcus coagulasa negativa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Escherichia coli*. En comparación con el presente estudio se encontraron bacterias similares como: *Staphylococcus coagulasa negativa*, *Streptococcus spp.* además de *Pantoea spp.*

Continuando con Rivera *et al.* (2012) se hace un análisis de resistencia por cada bacteria aislada, mencionando que el *Staphylococcus coagulasa negativa* muestra resistencia a la eritromicina y vancomicina, comparando con el estudio actual se aislaron 7 *Staphylococcus coagulasa negativa* de los cuales 4 mostraron diferentes resistencias. El primer *Staphylococcus coagulasa negativa* pertenece a la muestra E08 el cual es resistente a: la ampicilina, cefalotina, cefalexina, oxacilina, penicilina y tetraciclina. El segundo *Staphylococcus coagulasa negativa* es la muestra E45 el cual es resistente a la oxaciclina. El tercer *Staphylococcus coagulasa negativa* se refiere a la muestra E76 que resulta ser resistente a: ampicilina, amoxicilina + clavulanato, cefalotina, cefalexina, oxaciclina y penicilina. El cuarto *Staphylococcus coagulasa negativa* pertenece a la muestra E89 y es medianamente resistente a la doxiciclina y resistente a la tetraciclina.

Rivera *et al.* (2012) también menciona que el *Streptococcus spp.* es resistente a la amoxicilina + ácido clavulánico, vancomicina, eritromicina y oxitetraciclina. En la investigación actual realizada en leche cruda de cabra se logró aislar 2 *Streptococcus spp.* El primer *Streptococcus spp.* pertenece a la muestra E78 mostrando resistencia a la oxaciclina. El segundo *Streptococcus spp.* se refiere

a la muestra E84 y resulta ser resistente a: cefalexina, oxaciclina y Trimetoprim + Sulfametoxasole. Por último cabe recalcar que las resistencias que presentan estas bacterias son innatas, es decir que las propias bacterias han alterado su material genético para obtener estos genes de resistencia y poder transmitir a futuras generaciones o a otras especies bacterianas.

4.5 Limitaciones

- Las cabras al ser una especie con baja población en el Ecuador no existe acceso a datos de organismos oficiales, debido a que es una producción poco relevante en relación a otras especies como son los bovinos, porcino y aves.
- Al ser una especie poco relevante existe la venta informal de esta leche, sin embargo pocos animales poseen aretes o muescas que los identifican además tampoco existe una codificación única que apliquen los productores.
- Al ser una venta informal algunos productores se ven obligados a caminar y deambular hacia otros sitios diariamente por lo que es difícil localizarlos.
- Al no ser una venta regulada por ningún organismo los productores no tienen un calendario establecido, por lo que ciertos días o por diversas situaciones no asisten a la venta diaria.
- La cabra es un animal que posee una glándula mamaria pequeña en relación a la de la vaca por lo que la producción de leche diaria es de 4 o 5 litros incluso menos dependiendo del estado físico, condición corporal, condición nutricional y época de lactancia se encuentre el animal. Esto hace que la venta de la leche empiece y finalice a tempranas horas de la mañana.
- Al ser una venta informal los productores no llevan registros sanitarios de cada animal y tampoco hay órgano regulador que exija el cumplimiento de calendarios de vacunaciones o desparasitaciones.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1. Conclusiones

Al finalizar el presente estudio y valorar los resultados obtenidos, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Se lograron recolectar 90 muestras de leche cruda de cabra destinadas a consumo humano provenientes de diferentes productores, en un período de 4 semanas en las calles del sur del Distrito Metropolitano de Quito. Mediante el kit de prueba TRISENSOR® utilizado en estas muestras dentro del Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Universidad Central del Ecuador se pudo evidenciar la presencia de 2 tipos de antibióticos, los cuales fueron betalactámicos en su gran mayoría pero también tetraciclinas sin mostrar presencia de sulfaciclinas.
2. Después de analizar las 90 muestra de leche cruda se llegó a calcular las frecuencias con las que aparecieron los diferentes tipos de antibióticos. Se identificó que el 16,67% (n=15) de las muestras reaccionaron positivas a las tiras reactivas, donde el 93,33% (n=14) resultaron positivos a betalactámicos, el 6,66% (n=1) arrojaron positivo a tetraciclinas y finalmente 0% para sulfaciclinas.
3. A lo largo de esta investigación se llegó a la conclusión de que la existencia de trazas de antibióticos no solo en leche de cabra sino además de vaca es un problema a nivel mundial y se ha dado en países como España, México, Colombia, Nicaragua, El Salvador y Ecuador. Asimismo se debe tomar en cuenta como un problema en la salud pública puesto que las cantidades residuales en este producto de consumo humano sobrepasan los límites de antibióticos establecidos por los órganos reguladores como la FAO y el Codex Alimenticio.

5.2. Recomendaciones

- Implementar programas y medidas de capacitación y educación para los productores sobre la producción caprina y en el caso de uso de medicamentos informar sobre los tiempos de retiro y los efectos secundarios que puede causar en el consumidor.
- Realizar más estudios sobre la producción caprina para ayudar a ampliar la información y concientizar a la población de que el consumo de esta leche no está recomendada por las trazas de antibióticos que contiene.
- Regulaciones más estrictas por parte del organismo regulador ante este tipo de productos ambulantes puesto que representa un problema para la salud pública del país.
- Realizar estudios específicos a las bacterias resistentes aisladas en esta investigación para poder determinar los genes específicos que los hacen resistentes a los antibióticos probados en esta investigación.
- Continuar con la investigación ampliando las especies de estudio, puesto que también hay venta de leche de burra, hacer una identificación de las bacterias y una ultra-congelación de esta para poder utilizarlas en investigaciones futuras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche Principios de técnicas lecheras*. Barcelona, España: Editorial Reverté, S.A.
- Barrera, A y Ortez, E. (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*. Recuperado el 8 de diciembre del 2017 de <http://ri.ues.edu.sv/2198/1/13101313.pdf>
- Becton Dickinson. (2013). *BD Mannitol Salt Agar*. Recuperado el 12 de junio de 2017 de <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>
- Bio Bacter. (2015). *Agar Chocolate - Cat.01019 RS 2007RD-0000559*. Recuperado el 6 de mayo de 2017 de <http://www.bio-bacter.com/images/INSERTOS/CHOCOLATE.pdf>
- Britania Lab. (2001). *Mac Conkey Agar*. Recuperado el 6 de mayo de 2017 de <http://www.britanialab.com/productos/B23114%20REV%2001-MAC%20CONKEY%20AGAR.pdf>
- Britania Lab. (2001). *Mueller Hinton Agar*. Recuperado el 6 de mayo de 2017 de <http://www.britanialab.com/productos/B23137%20REV%2001-MUELLER%20HINTON%20AGAR.pdf>
- Callejo, A. (s, f). *Breve introducción a la anatomía de la ubre y a la fisiología del ordeño*. Recuperado el 04 de Enero de 2018 de http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordeno-mecanico/Tema_1._Anatomia_y_Fisiologia/breve-introduccion-a-la-anatomia-de-la-ubre-y-a-la-fisiologia-del-ordeno
- Chacón, A. (2005). *Aspectos nutricionales de la leche de cabra (capra hircus) y sus variaciones en el proceso agroindustrial*. Agronomía mesoamericana, N°16(2), 239-252.
- CHR HANSEN. (2009). *Betastar® Rapid Test*. Recuperado el 3 de Enero de 2017 de [http://www.promardairydirect.com/Images/EditorUploads/Files/Betastar%](http://www.promardairydirect.com/Images/EditorUploads/Files/Betastar%20Rapid%20Test.pdf)

20Information.pdf

Codex Alimentarius. (2015). *Residuos de Medicamentos Veterinarios en los alimentos*. Recuperado el 9 de mayo del 2017 de <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/vetdrugs/veterinary-drugs/es/>

Diario El Comercio. (2012). *Leche de cabra se vende sin regulaciones*. Recuperado el 16 de octubre de 2017 de <http://www.elcomercio.com/actualidad/quito/leche-de-cabra-se-vende.html>

es-climate-data.org. (2015). *Clima: Quito*. Recuperado el 29 de junio de 2016 de <http://es.climate-data.org/location/1012/>

Fernández, D. (2012). *Evaluación de los métodos de unión a receptores proteicos para la detección de antibióticos en la leche cruda de cabra*. Recuperado el 1 de enero de 2018 de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/27282/Tesina%20Darjaniva.pdf?sequence=1>

Ferrando, G, & Boza, J. (1990). *Lactación de la cabra y los factores que la regulan. Manuales de la Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, 2, 47-77.*

Heer, G. (2007). *Microbiología de la leche*. Recuperado el 7 de octubre del 2016 de <http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/tecnologialeche/informacion/microbiologia.pdf>

IDEXX. (2017). *Protocolos de pruebas SNAP*. Recuperado el 02 DE Enero de 2018 de <http://www.idexx.es/dairy/tests/protocols.html>

INEC. (2015). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2015*. Recuperado el 11 de mayo de 2017 de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2014-2015/2015/2015/Presentacion%20de%20resultados%20ESPAC_2015.pdf

INEC. (2016). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2016*. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de

http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2016/Informe%20ejecutivo%20ESPAC_2016.pdf

Klein, B. (2014). *Fisiología veterinaria*. (5ta.ed.). Barcelona, España: Elsevier Saunders.

Lara, C y Ortega, A. (2012). *Propuesta de la factibilidad para la industrialización de la leche de cabra en el cantón mira, provincia del Carchi, estudio del caso asomienprolecamira (asociación micro empresarial de productores de leche de cabra)*. Recuperado el 13 de mayo de 2017 de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1610/1/T-UCE-0005-218.pdf>

Lázaro, E y Oteo, J. (2006). *Evolución del consumo y de la resistencia a antibióticos en España*. Recuperado el 8 de julio del 2017 de <http://www.msc.es/biblioPublic/publicaciones/docs/evolucionConsumoResistenciaAntibioticos.pdf>

Martín del Campo, M., Gómez, H. y Alaníz, R. (2008). *Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos*. Recuperado el 16 de octubre de 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73011197005>

Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M. y Tordecilla, G. (2009). *Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública*. Recuperado el 8 de julio del 2017 de <http://www.bdigital.unal.edu.co/36399/1/37097-158710-1-PB.pdf>

MDM Científica. (2013). *Agar Sangre*. Recuperado el 11 de mayo de 2017 de <http://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2017/06/Agar-SANGRE-DE-CORDERO-MDM-cient%C3%ADfica-Colombia-O-P.PD-01-INSERTO.pdf>

Pozo, R., Herrera, A., Polo, L., López, R., Jodral, M y Iglesias, J. (1977). *Investigación sobre la presencia de antibióticos en la leche en la región sur de España*. Recuperado el 13 de noviembre de 2017 de

https://www.researchgate.net/profile/Manuela_Jodral/publication/43128299_Investigacion_sobre_la_presencia_de_antibioticos_en_la_leche_en_la_region_sur_de_Espana/links/00b7d53b1464dc287c000000/Investigacion-sobre-la-presencia-de-antibioticos-en-la-leche-en-la-region-sur-de-Espana.pdf

Ramírez A, Gutiérrez R, González C, Escobar I, Castro G, Díaz G y Noa M. (2001). *Detección de antibióticos en leche comercializada en la ciudad de México*. Recuperado el 28 de noviembre de 2017 de <http://img.realfitness.es/2015/10/Detecci%C3%B3n-de-antibi%C3%B3ticos-en-leche-comercializada-en-la-ciudad-de-M%C3%A9xico.pdf>

Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 6(5) pp. 1-5. Recuperado el 7 de diciembre de 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73011197005>

Rivera, M. y Tórrez, M. (2012). *Resistencia antimicrobiana de bacterias aisladas en leche de vaca con mastitis subclínica, en fincas que bastecen los centro de acopio de Achuapa y Larreynaga; Semptiembre – Noviembre 2011*. Recuperado el 5 de enero de 2018 de <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/5659/1/221120.pdf>

Senger, L. (2005). *Pathways to pregnancy and parturition*. (2da. Ed.). Estados Unidos: Mcgraw-Hill.

Thorogood, S y Ray, A. (1994). *An evaluation of the PenzymB assay: a rapid method for the detection of P-lactam antibiotics in milk*. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 37 (2), 38-40. Doi: 10.1111/j.1471-0307.1984.tb01234.x

Zabala, C. (2013). *Identificación de la presencia de Brucella en Cabras en la zona urbana de Quito*. Recuperado el 16 de octubre de 2016 de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/2094/1/106849.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Selección de los animales de estudio.

Foto 1.



Foto 2.



Foto 3.



Anexo 2. Recolección de muestras de distintos animales.

Foto 1.



Foto2.



Foto 3.



Anexo 3. Colecta de la muestra.

Foto 1.

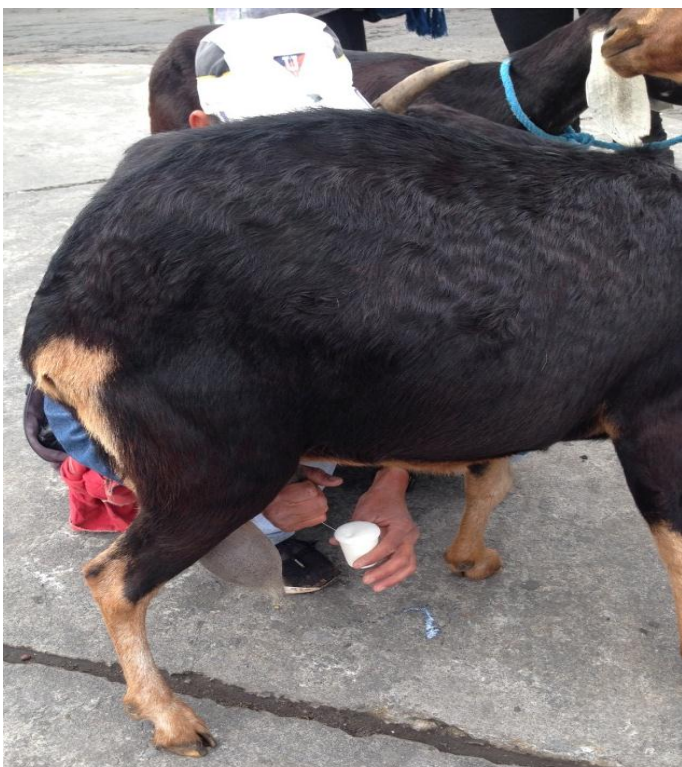


Foto 2.



Anexo 4. Traspaso de la muestra a un envase estéril.



Anexo 5. Kit Trisensor® utilizado en la investigación.



Anexo 6. Preparacion de equipos – horno calentador.



Anexo 7. Proceso de identificacion de antibióticos.

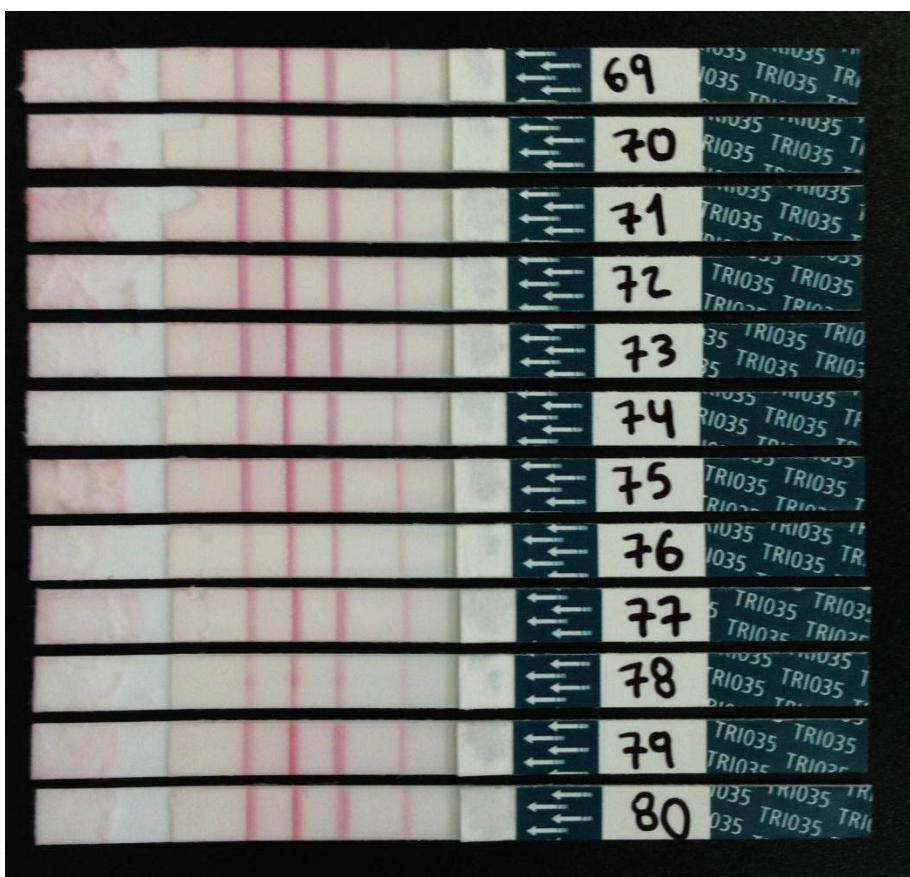


Anexo 8. Identificación de antibióticos – tiras reactivas positivas y negativas

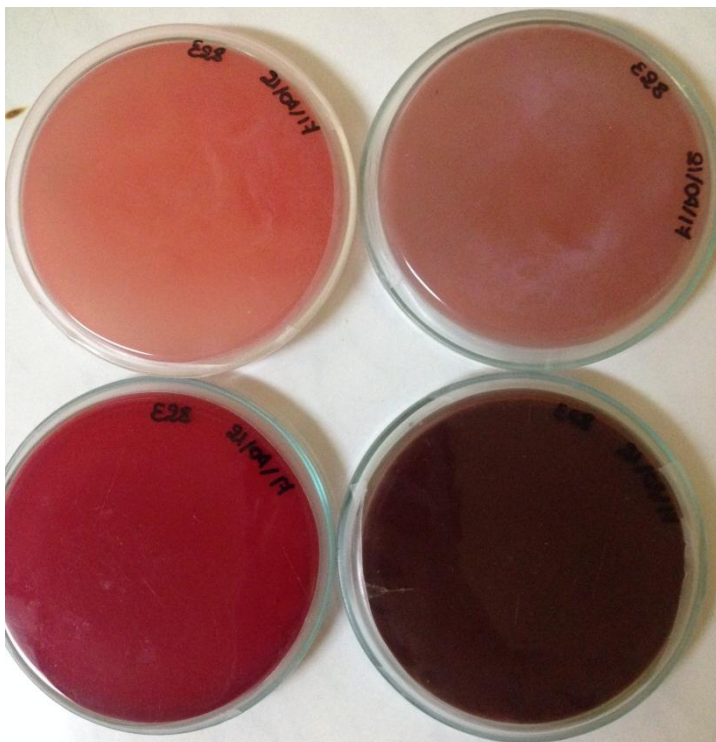
Foto 1.



Foto 2.



Anexo 9. Siembra de leche en diferentes tipos de agares.



Anexo 10. Crecimiento de colonias bacterianas.

Foto 1.

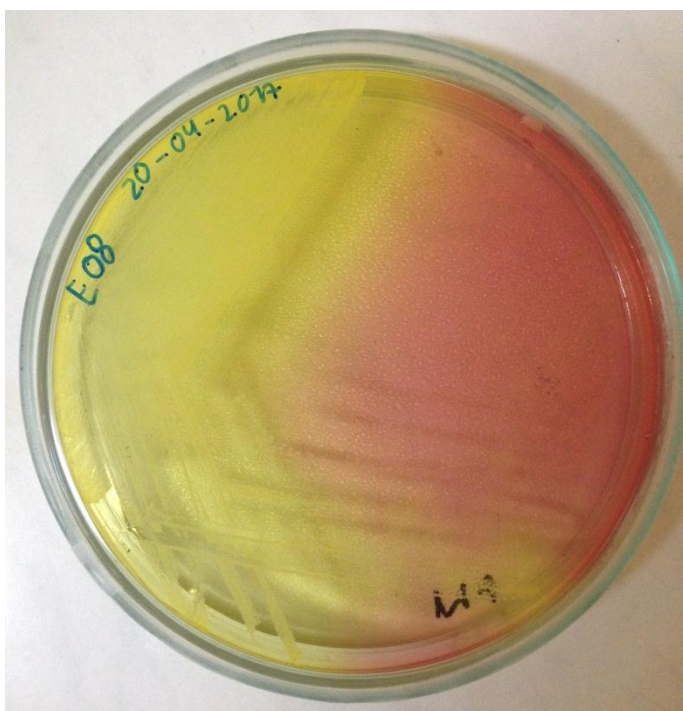


Foto 2.

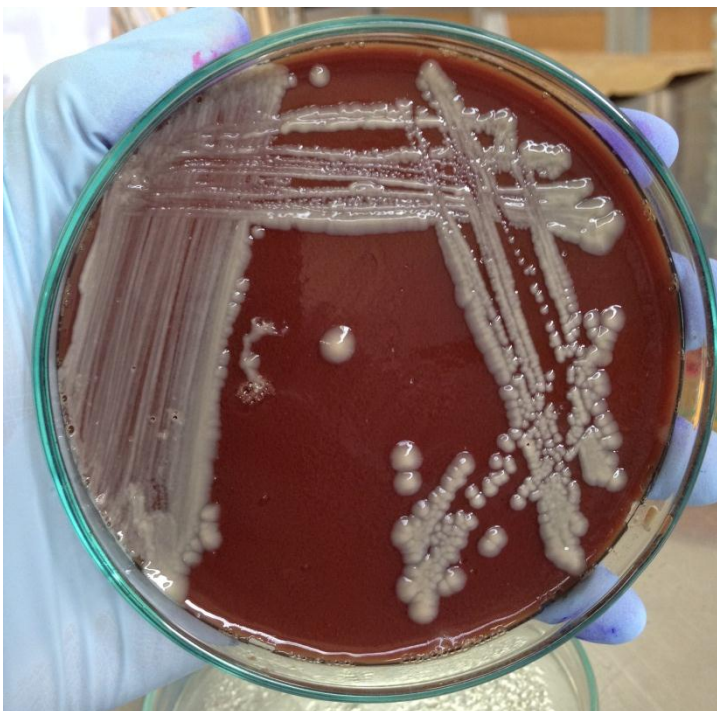


Foto 3.



Anexo 11. Tinción gram.

Foto 1.

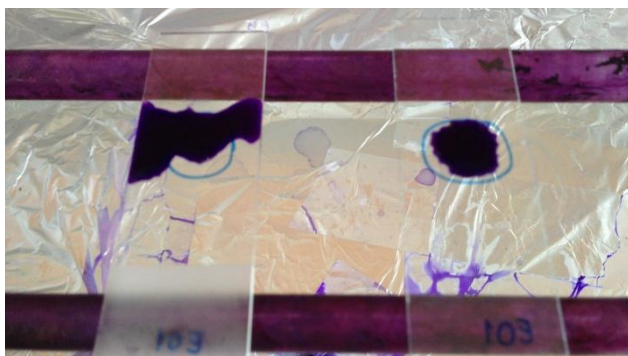


Foto 2.

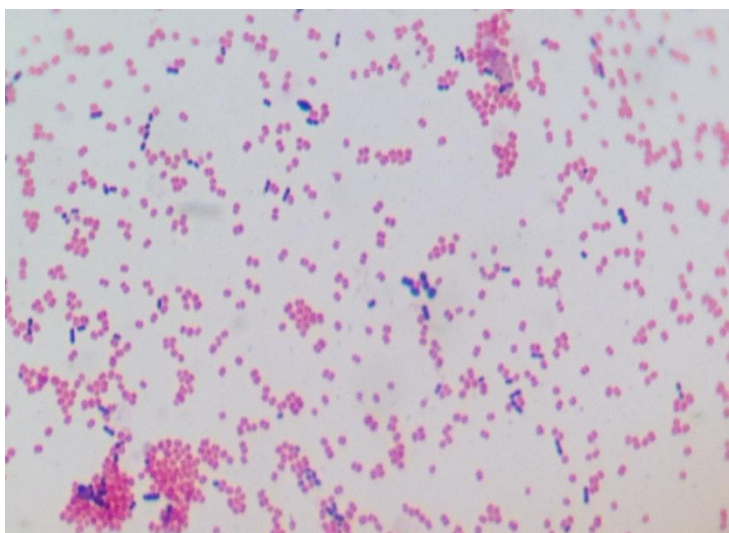
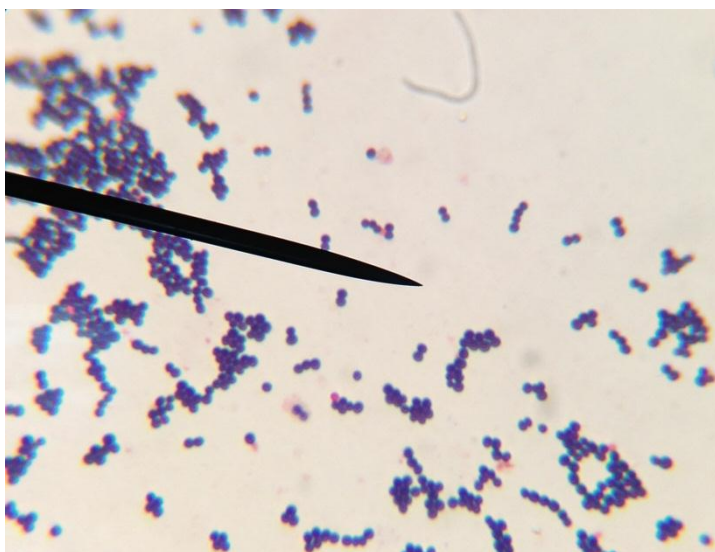


Foto 3.



Anexo 12. Pruebas de identificación

Foto 1.

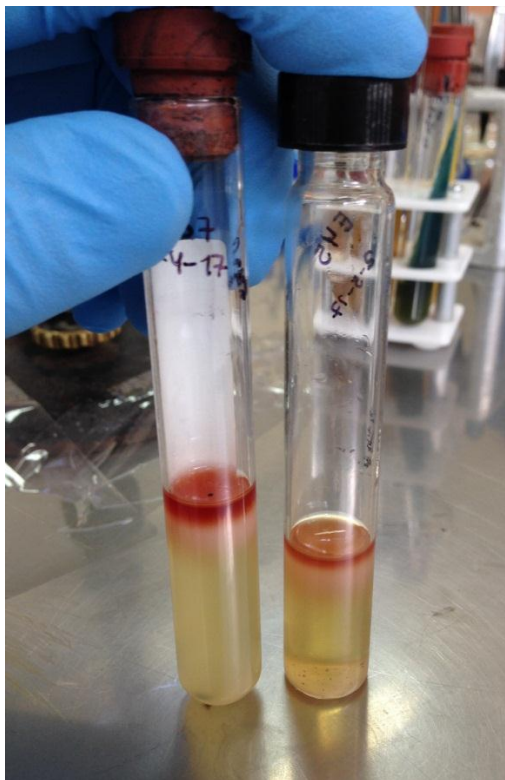


Foto 2



Foto 3.



Anexo 13. Bacteria identificada – *Pantoea* spp.

Foto 1.

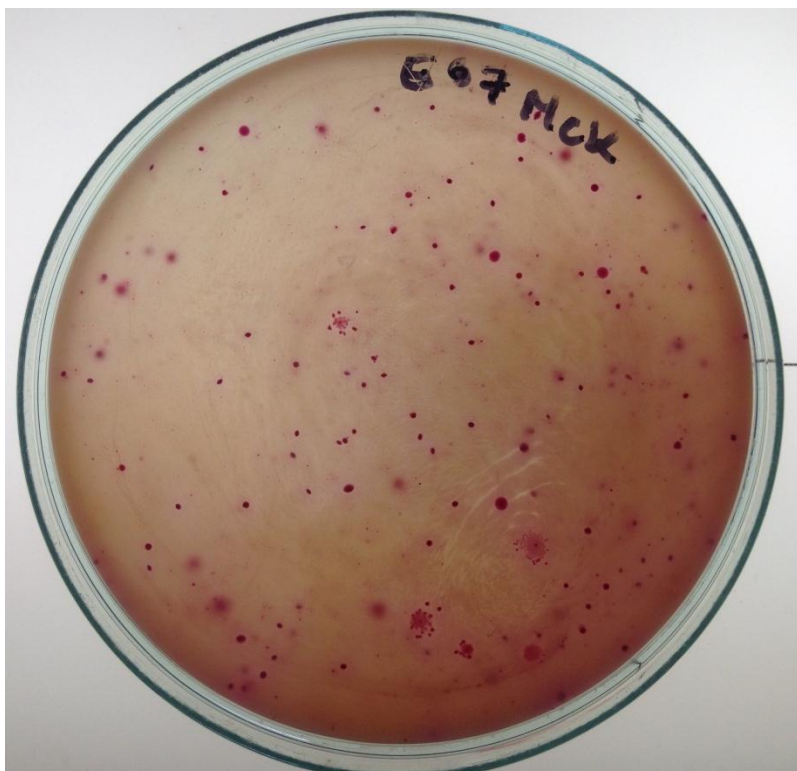
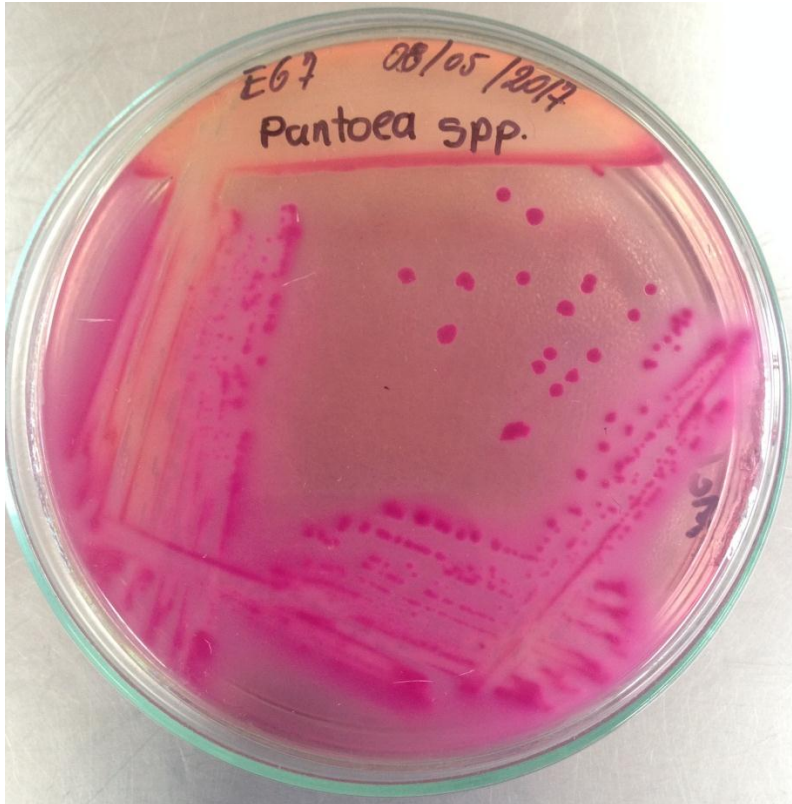


Foto 2.



Foto 3



Anexo 14. Antibiogramas

Foto 1.

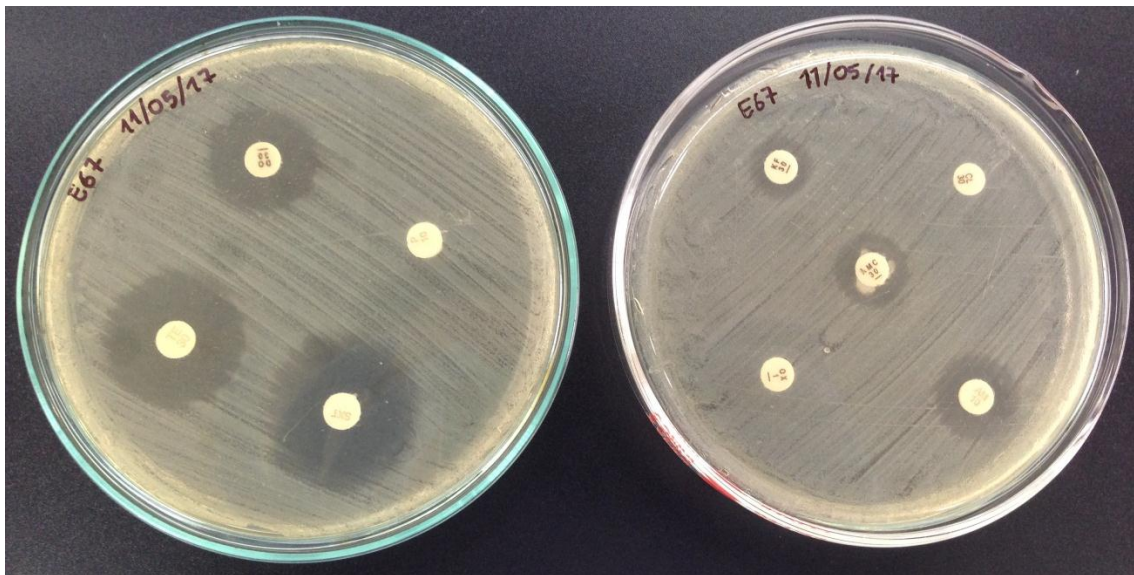


Foto 2.

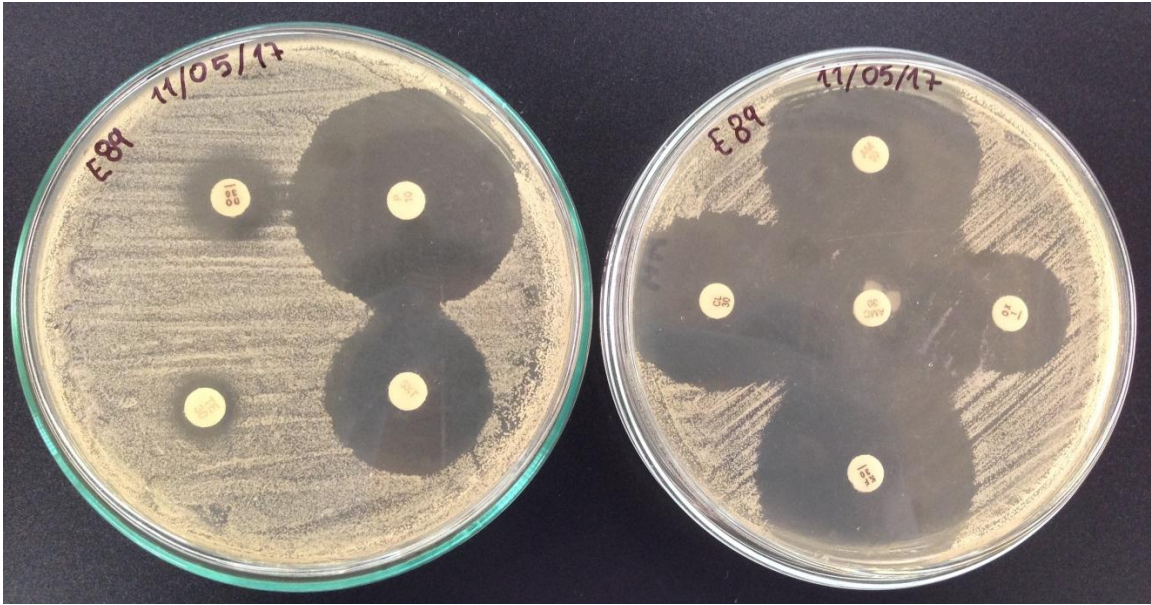


Foto 3.

