

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO PREVIO LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO EN :
MAGÍSTER EN QUÍMICA APLICADA

TEMA:
EVALUACIÓN DE UN MÉTODO INMUNOCROMATOGRÁFICO
PARA LA DETECCIÓN DE AFLATOXINA AFM1 EN LECHE
CRUDA

Autor :
Utreras Peñafiel Johanna Sofía

Director :
Villamar Aveiga Mónica del Rocío

Milagro, Octubre 2022

DERECHOS DE AUTOR

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Utreras Peñafiel Johanna Sofía** en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Química Aplicada** como aporte a la Línea de Investigación **Desarrollo Productivo** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 07 noviembre del 2022



Firmado electrónicamente por:
**JOHANNA SOFIA
UTRERAS
PENAFIEL**

Quím. Johanna Utreras

CI. 1720935293

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Villamar Aveiga Mónica del Rocío** en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por **Utreras Peñafiel Johanna Sofía**, cuyo tema es “**Evaluación de un Método Inmunocromatográfico para la detección de Aflatoxina M1 en leche cruda**”, que aporta a la Línea de Investigación **Desarrollo Productivo**, previo a la obtención del Grado **Magíster en Química Aplicada**. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 07 de noviembre 2022



Firmado electrónicamente por:
**MONICA DEL
ROCIO VILLAMAR
AVEIGA**

MÓNICA DEL ROCÍO VILLAMAR AVEIGA

C.I: 0918306507

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN QUÍMICA APLICADA**, presentado por **ING. UTRERAS PEÑAFIEL JOHANNA SOFÍA**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "EVALUACIÓN DE UN MÉTODO INMUNOCROMATOGRÁFICO PARA LA DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1 EN LECHE CRUDA", las siguientes calificaciones:

TRABAJO DE TITULACION	59.33
DEFENSA ORAL	40.00
PROMEDIO	99.33
EQUIVALENTE	Excelente



Firmado electrónicamente por:
**DELIA DOLORES
NORIEGA VERDUGO**

**Mgtr. NORIEGA VERDUGO DELIA DOLORES
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL**



Firmado electrónicamente por:
**JUAN DIEGO
VALENZUELA
COBOS**

**Ph.D. VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO
VOCAL**



Firmado electrónicamente por:
**FREDDY ANDRES
ESPINOZA
CARRASCO**

**Mgs. ESPINOZA CARRASCO FREDDY ANDRES
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL**

DEDICATORIA

“Cuando sientas que vas a rendirte, piensa porque empezaste”

Anónimo

A mis padres

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres quienes siempre han sido mi apoyo y mi guía, han sido una parte muy importante para que logre alcanzar todas mis metas y sueños. Un especial agradecimiento para mi esposo quien es mi compañía, mi apoyo y es quien me incentiva a ser mejor cada día.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional y personal a las que me encantaría agradecerles por su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otros me acompañan y guían desde el cielo (Papito gracias por todo te llevo en mi corazón), sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Ha sido un camino largo, cansado y arduo el cual incluyó una larga pandemia con la que hemos aprendido a vivir, nos deja duras enseñanzas, hemos aprendido a valorar cada momento que vivimos a apreciar las oportunidades y a ser mejores cada día; durante esta largo camino se ha superado obstáculos y ahora he llegado a la meta propuesta. Gracias a todos por formar parte de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	4
1. EL PROBLEMA	4
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.1.1. Problematización.....	4
1.1.2. Delimitación del problema.....	5
1.1.3. Formulación del problema	5
1.2. OBJETIVOS.....	5
1.2.1 Objetivo General	6
1.2.2. Objetivos Específicos.....	6
1.3. JUSTIFICACIÓN	6
CAPÍTULO II.....	8
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1 ANTECEDENTES	8
2.1.1. Antecedentes Históricos.....	8
2.1.2. Antecedentes Referenciales	9
2.2 LECHE.....	9
2.2.1 Definición de Leche	9
2.2.2 Composición de la leche.....	10
2.3 MARCO LEGAL – NORMATIVA.....	11
2.3.1 Norma NTE/INEN 9:2012- Requisitos de la leche cruda.....	11
2.3.2 Organización Internacional de Normalización -ISO 14674:2005	13
2.3.3 Codex Alimentarius (CODEX STAN 193-1995).....	13
2.4 AFLATOXINAS.....	14
2.4.1 Generalidades	14
2.4.2 Toxicología	15
2.4.3 Toxicocinetica	16
2.4.4 Aflatoxina AFM1 en leche	17

2.5	TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS DE ORIGEN ANIMAL	19
2.5.1	Técnica Inmunoensayo ELISA.....	19
2.5.2	Técnicas Inmunocromatograficas.....	20
2.5.2.1.	Método rápido – Rapid Test.....	21
CAPÍTULO III		22
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1	MATERIALES Y REACTIVOS	22
3.2	EQUIPO	22
3.3	METODOLOGÍA	23
3.3.1	Recolección de las muestras	23
3.3.2	Conservación de las muestras	23
3.3.3	Tratamiento de las muestras	23
3.3.4	Análisis de aflatoxina M1 en leche por el método rápido	24
3.3.5	Análisis de muestras por método ELISA	25
3.3.6	Procesar y comparar los datos obtenidos del método rápido y método tradicional mediante el software estadístico Statgraphics Centurion.....	25
CAPITULO IV		26
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	26
4.1	Toma de muestras	26
4.2	Análisis de muestras de leche cruda utilizando prueba rápida de Shenzhen Bioeasy Biotechnology (Aflatoxin M1 Quantitative Rapid test strip in milk)	27
4.3	Análisis de muestras de leche cruda analizadas por método tradicional ELISA en laboratorio externo.....	29
4.4	Análisis estadístico	30
CAPÍTULO V		33
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
5.1	CONCLUSIONES.....	33
5.2	RECOMENDACIONES.....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		35
ANEXOS		37
ANEXO 1		37
Componentes del Kit rápido.....		37
ANEXO 2		38

Análisis de muestras de leche cruda utilizando prueba rápida de Shenzhen Bioeasy Biotechnology.....	38
ANEXO 3	45
Resultado verificación tirilla control	45
ANEXO 4	47
Resultados método ELISA.....	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Requisitos fisicoquímicos de la leche	12
Cuadro 2. Límites máximos para contaminantes.....	12
Cuadro 3. Identificación de las muestras	24
Cuadro 3. Resultados obtenidos con Kit prueba rápida (AFM1) muestra de leche cruda.....	27
Cuadro 4. Resultados con Kit prueba rápida (AFM1) muestra control (C1) de leche cruda 0,250 ppb.	28
Cuadro 5. Resultados con Kit prueba rápida (AFM1) muestra control (C2) de leche cruda 0,350 ppb	28
Cuadro 6. Resultados con Kit prueba rápida (AFM1) muestra control (C3) de leche cruda 0,550 ppb.	28
Cuadro 7. Resultados laboratorio LASA	29
Cuadro 8: Test de Normalidad Aflatoxina M1 kit rápido	30
Cuadro 9: Test de Normalidad Aflatoxina M1 MicroElisa	31
Cuadro 10. Prueba Mann-Whitney (Wilcoxon) comparación de método rápido y método tradicional.	32
Figura 7. Diagrama de caja y bigote prueba Mann-Whitney (Wilcoxon).....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración de la conversión de aflatoxina B1(AFB1) en aflatoxina M1(AFM1)	17
Figura 2. Principio ELISA competencia directa.....	20
Figura 3. Componentes del Kit rápido para Aflatoxina M1.....	21
Figura 5. Histograma Aflatoxina M1 kit rápido	31
Figura 6. Histograma Aflatoxina M1 MicroElisa.....	31

RESUMEN

La aflatoxina M1 (AFM1) en la leche y los productos lácteos se ha reconocido como un problema durante los últimos años, el control de aflatoxina M1 en la leche es importante para proteger la salud humana y el comercio ya que no se destruye durante el proceso de pasteurización ni durante la preparación de los derivados lácteos; para las agencias gubernamentales responsables de la salud pública la detección de la aflatoxina AFM1 es un tema de gran interés ya que buscan minimizar el peligro para la salud, en Ecuador. La Norma NTE INEN 0009:2012 detalla los parámetros físicos-químicos-biológicos que debe cumplir la leche fresca para consumo humano la cual estableció un límite máximo de 0.5 µg / kg de AFM1 en leche cruda. El seleccionar un método adecuado para la detección y cuantificación de la aflatoxina AFM1 consiste ser un desafío, debido a que para su práctica se debe evaluar factores que pueden limitar la implementación. Esta investigación evaluó un método rápido para la detección cuantitativa de aflatoxina AFM1 en leche cruda basado en tecnología de inmunocromatografía y se comparó los resultados obtenidos con el método tradicional inmunológico (ELISA). A los resultados obtenidos se realizó la prueba de Shapiro -Wilk obteniendo un valor de *P-value* 0,073 para el análisis de la prueba de aflatoxina M1 con kit rápido, mientras que para la prueba ELISA se obtuvo un *P-value* 0,031 lo que demuestra que los datos de las pruebas no siguen una distribución normal ($p \leq 0,05$). Se utilizó pruebas no paramétricas que determinaron que no existe diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre los datos, demostrando que la prueba rápida es igual de efectiva que el método tradicional ELISA y que es capaz de identificar de forma rápida aflatoxina M1, garantizando la inocuidad de la leche cruda en las granjas lecheras.

Palabras claves: método rápido, aflatoxina M1, leche cruda, contaminación alimentaria

ABSTRACT

Aflatoxin M1 (AFM1) in milk and milk products has been recognized as a problem in recent years, control of aflatoxin M1 in milk is important to protect human health and trade as it is not destroyed during processing pasteurization or during the preparation of dairy products; For government agencies responsible for public health, the detection of aflatoxin AFM1 is a topic of great interest since they seek to minimize the danger to health in Ecuador. The NTE INEN 0009:2012 Standard details the physical-chemical-biological parameters that must be met by fresh milk for human consumption, which established a maximum limit of 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of AFM1 in raw milk. Selecting an adequate method for the detection and quantification of aflatoxin AFM1 is a challenge, because for its practice, factors that may limit its implementation must be evaluated. This research evaluated a rapid method for the quantitative detection of aflatoxin AFM1 in raw milk based on immunochromatography technology and compared the results obtained with the traditional immunological method (ELISA). The Shapiro-Wilk test was performed on the results obtained, obtaining a P-value of 0.073 for the analysis of the aflatoxin M1 test with a rapid kit, while a P-value of 0.031 was obtained for the ELISA test, which shows that the test data do not follow a normal distribution ($p \leq 0.05$). Non-parametric tests were used that determined that there is no significant difference ($p \leq 0.05$) between the data, demonstrating that the rapid test is as effective as the traditional ELISA method and that it is capable of quickly identifying aflatoxin M1, guaranteeing the safety of raw milk on dairy farms.

Keywords: rapid method, aflatoxin M1, raw milk, food contamination

INTRODUCCIÓN

(Landeros et al., 2012) Las aflatoxinas (AF) son metabolitos tóxicos, inmunosupresivos y carcinógenos, producidas por diferentes especies de hongos del género *Aspergillus*, particularmente *A. flavus* y *A. parasiticus*, y se encuentran como contaminantes naturales en alimentos poniendo en peligro la salud humana. La aflatoxina B1 (AFB1) es considerada el compuesto más tóxico producido por estos hongos, tras su ingestión su alta solubilidad en grasas favorece la absorción gastrointestinal llegando al hígado esta micotoxina es biotrasformada por el citocromo P450 microsomal en su metabolito hidroxilado: la aflatoxina M1 (AFM1), que luego se excreta en la leche de animales que han consumido alimentos contaminados con (AFB1).

La aflatoxina M1 (AFM1) en la leche y los productos lácteos se ha reconocido como un problema durante más de 30 años. El control de AFM1 en la leche es importante para proteger la salud humana y el comercio ya que no se destruye durante el proceso de pasteurización ni durante la preparación de los derivados lácteos; se ha verificado que pueden iniciar y hacer avanzar el cáncer de hígado, pulmón y colón, el 43,9% del total anual de casos de cáncer de hígado están asociados con la ingesta de AFM1. (Puga-Torres et al., 2020)

La AFM1 se encuentra en todo el mundo; sin embargo, los niveles varían considerablemente en diferentes regiones, dependiendo del sistema de producción de leche, el clima y las especies lecheras; estos problemas son mucho más graves en los países de bajos ingresos, donde su presencia puede ser común e incluso extrema. Se considera que la presencia de AFM1 está relacionada con determinadas condiciones ambientales de humedad y temperatura que facilitan el crecimiento de los hongos en los alimentos; además, durante el buen tiempo, en muchas zonas el ganado se alimenta de pastos, pero en época de frío y/o sequías existe el riesgo de que los piensos que se utilizan para alimentarlos hayan estado almacenados durante un largo periodo y por lo tanto estar contaminados. (Puga-Torres et al., 2020)

En Ecuador existen aproximadamente 294.000 productores de leche, la mayoría, el 80 %, son pequeños y el 20 % se reparten entre medianos y grandes, en total producen al día 6,15 millones de litros de leche (cifras del 2020 de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria). Para las agencias gubernamentales responsables de la salud pública la detección de la aflatoxina AFM1 es un tema de gran interés, así como para la industria láctea los cual deben asegurar la inocuidad de la leche cruda; la aflatoxina M1 (AFM1) después de su bioconversión de la aflatoxina B1 en el hígado animal se convierte en parte de la leche y de los productos lácteos durante la manipulación en la cadena de suministro; las aflatoxinas son un compuesto tóxico que deben ser monitoreados continuamente para evitar cualquier dolencia entre los consumidores de alimentos contaminados con dichos tóxicos.

Con el fin de minimizar el peligro para la salud de AFM1, algunos países han establecido límites reglamentarios para ella en la leche y productos lácteos, en Ecuador existe la norma que estandariza los parámetros de calidad de la leche cruda a ser comercializada y procesada en la industria, es la Norma NTE INEN 0009:2012 este documento detalla los parámetros físicos-químicos-biológicos que debe cumplir la leche fresca para consumo humano la cual estableció un límite máximo de 0.5 µg / kg de AFM1 en leche cruda.

El seleccionar un método adecuado para la detección y cuantificación de la aflatoxina M1 consiste ser un desafío, debido a que para su implementación se debe evaluar los factores que lo limitan como son los costos, equipamiento, capacitación técnica, infraestructura de laboratorios, tiempo entre la recolección y el resultado. La cromatografía líquida (HPLC) y el método ELISA son métodos usados con mayor frecuencia en el análisis de aflatoxina AFM1 en leche cruda, estos son difíciles de realizar en las granjas lecheras y requieren tiempo para producir resultados. Estas desventajas pueden impedir la distribución de leche fresca. Por lo tanto, es deseable introducir un método rápido y sencillo para el análisis preliminar de AFM1.(Yoshinari et al., 2016)

Esta investigación tiene como objetivo evaluar un método rápido para la detección cualitativa y cuantitativa de aflatoxina M1 en leche cruda basado en tecnología de inmunocromatografía basado en nanopartículas de oro coloidal con anticuerpos específicos, consta de una tira de

detección rápida y un lector con un ID card que contiene una curva para cuantificar la cantidad de aflatoxina presente; los resultados obtenidos serán comparados estadísticamente con los proporcionados por un laboratorio utilizando un método un método inmunológico (ELISA) utilizado ampliamente en la investigación de las aflatoxinas, debido a su sensibilidad y especificidad, a través de ello se demostrará la eficacia y confiabilidad del método rápido propuesto para la detección de aflatoxina AFM1 en leche cruda.

CAPÍTULO I

1. EL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.1. Problematización

En Ecuador existe una norma que estandariza los parámetros de calidad de la leche cruda a ser comercializada y procesada en la industria, muchos de estos parámetros lo encontramos en la Norma NTE INEN 9:2012, es el documento certificado que detalla los parámetros fisicoquímicos, contaminantes y biológicos que debe cumplir la leche fresca para consumo humano. La conocida norma emitida por el Instituto Nacional de Normalización y Estandarización, son reglas y requisitos que deben cumplir las entidades dedicadas a la elaboración y producción de diferentes tipos de leche, entre los que se apuntan los de carácter alimenticio. (Marañón, 2017)

Los métodos tradicionales no están exentos de inconvenientes. Por ello, es pertinente evaluar los factores que limitan sus costos de implementación (equipamiento, capacitación técnica, infraestructura de laboratorios, costo por análisis, tiempo entre la recolección y el resultado); destacando la dificultad de analizar grandes volúmenes de muestras en tiempos reducidos, indispensable para llevar a cabo los programas de vigilancia, control efectivo en los análisis de calidad o el requerimiento de tratamientos de muestra laboriosos y equipos costosos, por lo que es necesario desarrollar nuevos métodos simples y con rapidez de obtención en resultados. Esta investigación quiere mostrar la eficiencia y la confiabilidad de un método rápido que detecta y cuantifica la presencia de aflatoxina M1 en leche cruda basado en tecnología de inmunocromatografía de oro coloidal.

1.1.2. Delimitación del problema

Es una investigación de tipo experimental, cualitativa y cuantitativa se realizó ensayos en muestras de leche cruda obtenidas de productores lecheros ubicados en la provincia de Pichincha cantón Mejía. Los análisis de la prueba rápida (Aflatoxin M1 Quantitative Rapid test strip in milk) se realizaron en las instalaciones de Sudmilk- Bioesay Ecuador, para el método tradicional de ELISA las muestras fueron enviadas al Laboratorio LASA.

1.1.3. Formulación del problema

En base a los antecedentes mencionado anteriormente, se expone las siguientes interrogantes:

¿Es eficiente la utilización de métodos rápidos en la detección cuantitativa de aflatoxina M1 en leche cruda con respecto al método tradicional? ¿Es precisa y confiable la respuesta proporcionada por un método rápido en comparación con los resultados emitidos por un método tradicional (ELISA)? ¿El método inmunocromatográfico es apto para el uso requerido?

De acuerdo con lo establecido se plantea la siguiente hipótesis:

H₀: Las pruebas rápidas son igual de efectivas que las pruebas tradicionales en la detección cuantitativa de aflatoxina M1 en leche cruda.

H_a: Las pruebas rápidas no son igual de efectivas que las pruebas rápidas en la detección cuantitativa de aflatoxina M1 en leche cruda.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

- ❖ Comparar la efectividad de un método rápido frente a un método tradicional en la detección cuantitativa de aflatoxina M1 en leche cruda del cantón Mejía.

1.2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Recolectar muestras de leche cruda de un productor lechero del cantón Mejía mediante el instructivo INT/CL/010 “toma de muestras de leche cruda y suero de leche”
- ❖ Analizar las muestras de leche cruda utilizando la prueba rápida de Shenzhen Bioeasy Biotechnology (Aflatoxin M1 Quantitative Rapid test strip in milk)
- ❖ Analizar las muestras de leche cruda por medio del método tradicional ELISA en un laboratorio externo.
- ❖ Procesar y comparar los datos obtenidos del método rápido y método tradicional mediante el software estadístico Statgraphics Centurion.

1.3. JUSTIFICACIÓN

La aflatoxina B1 (AFB1) es un compuesto tóxico producido por los hongos del género *Aspergillus*, particularmente *A. flavus* y *A. parasiticus*. La aflatoxina M1 (AFM1) en la leche y los productos lácteos se ha reconocido como un problema durante más de 30 años, su estudio es importante para proteger la salud humana y el comercio ya que no se destruye durante el proceso de pasteurización ni durante la preparación de los derivados lácteos.

Los factores de los métodos tradicionales como los tiempos de implementación, la técnica, el costo de análisis y el tiempo de emitir resultados, lleva a desarrollar nuevos métodos que sean más simples y con rapidez en obtención de resultados, siendo indispensable para el control efectivo en los análisis de calidad en la industria. Esta investigación estuvo dirigida hacia utilización de una prueba rápida de Shenzhen Bioeasy Biotechnology (Aflatoxin M1 Quantitative Rapid test strip in milk) para la determinación de aflatoxina M1 en leche cruda a través de la comparación de resultados obtenidos de un método tradicional frente al método rápido inmunocromatográfico el cual dará soporte para que las entidades de control, así como la industria láctea puedan identificar de forma rápida la contaminación con aflatoxina M1 garantizando la inocuidad de la leche cruda.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1. Antecedentes Históricos

La presencia de aflatoxinas en los alimentos es una de las principales preocupaciones de salud por parte de las agencias reguladoras, existen cuatro aflatoxinas importantes: B1 , B2, G1,G2 y los productos metabólicos adicionales, M1 y M2. Las aflatoxinas M1 y M2 fueron aisladas de la leche de animales alimentados con piensos contaminados; la designación con la letra M, proviene de milk; debido a que constituyen un riesgo para la población, particularmente en niños debido a la importancia de este producto en su alimentación y a que son considerados más susceptibles a sus efectos adversos.

Existen estudios realizados en la Unión Europea los cuales han establecido el límite máximo de residuos (LMR) para la AFM1 de 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en leche fluida, mientras que en México las normas NMX- F-700-COFOCALEC-2004 y NOM-243-SSA1-2010, para leche cruda y pasteurizada respectivamente, especifican el límite máximo de 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$.(Landeros et al., 2012) mismo valor aceptado en los Estados Unidos de América. En Ecuador en el año 2012 la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE) INEN 9 estableció un límite máximo de 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para AFM1 en leche.

Actualmente la calidad e inocuidad alimentaria son factores cada vez más relevantes en prácticamente todos los países, dentro de los alimentos disponibles, la leche es considerada como uno de los alimentos más completos que existe en la naturaleza. A fin de asegurar la calidad de la leche, se deben considerar todos los niveles de la cadena alimentaria, donde cada eslabón influye sobre las características finales del producto. (Rojas, Luis Jorge et al., 2017)

2.1.2. Antecedentes Referenciales

La investigación tomó como base fundamental dos documentos, el primero titulado “EVALUATION OF FOUR COMMERCIAL KITS BASED ON IMMUNOCHROMATOGRAPHY FOR SCREENING AFLATOXIN M1 IN MILK” trabajo efectuado por Tomoya Yoshinari, Takahiro Ohnishi and Jun Terajima del Instituto Nacional de Ciencias de la Salud, este trabajo habla sobre la adopción de un método que utiliza un kit inmunocromatográfico como método oficial de detección de Aflatoxina M1 en leche. El segundo documento en el que se basó en un estudio realizado en el año 2020 por Byron Puga-Torres, David Salazar, Mayra Cachiguango, Gabriela Cisneros y Carlos Gómez-Bravo titulado “DETERMINACIÓN DE AFLATOXINA M1 EN LECHE CRUDA DE DIFERENTES PROVINCIAS DEL ECUADOR” el cual tiene como objetivo determinar la presencia de aflatoxina M1 en leche cruda en tres provincias del Ecuador cuyas áreas representan alrededor del 30 % de la producción de leche; en este trabajo las muestras fueron medidas con ensayo inmunocromatográficos de flujo lateral.

2.2 LECHE

2.2.1 Definición de Leche

Producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada a un tratamiento posterior previo a su consumo. (INEN, 2012)

La leche es una compleja mezcla de distintas sustancias, presentes en suspensión o emulsión y otras en forma de solución verdadera y presenta sustancias definidas: agua grasa, proteína, lactosa, vitaminas, minerales; a las cuales se les denomina extracto seco o sólidos totales. Los elementos que la componen varían por la interacción de numerosos factores internos y externos al animal: especie, raza, alimentación, época del año, ordeño, salud del animal, lactancia, etc. (Marañón, 2017)

2.2.2 Composición de la leche

La leche es uno de los principales alimentos importantes por las personas y se caracteriza por su contenido en proteínas que es alto valor biológico, así como por ser una fuente importante de minerales, como el calcio, fósforo, magnesio, potasio y diversas vitaminas, como la vitamina A y ácido fólico.(Saraguro-Aguilar, 2019)

La leche es una compleja mezcla de distintas sustancias, presentes en suspensión o emulsión y otras en forma de solución verdadera y presenta sustancias definidas: agua grasa, proteína, lactosa, vitaminas, minerales; a las cuales se les denomina extracto seco o sólidos totales. La composición de la leche varía en función de factores como la especie y raza animal, la alimentación, el momento del ordeño y el periodo post-parto, entre otros. Se trata de un alimento líquido con un aporte energético considerable (65 kcal/100 g), cuyo componente mayoritario es el agua (86-88%) y en el que coexisten en equilibrio nutrientes en estado de disolución, dispersión coloidal y emulsión.

A continuación, se muestra los valores de referencia de algunos parámetros fisicoquímicos de la leche entre los que destacan:

- **Hidratos de carbono.** La lactosa o azúcar de la leche es el hidrato de carbono mayoritario y su contenido se sitúa entre 4-5%.
- **Proteínas.** La leche de vaca contiene un 3-3,5% de proteínas, de las cuales la fracción caseínica es la mayoritaria, representando el 80%, este valor depende de la alimentación del ganado, la raza y la cantidad de grasa en la leche. El 20% restante estaría compuesto por proteínas solubles del lactosuero, entre las que se incluyen lactoalbúminas, lactoglobulinas, seroalbúminas e inmunoglobulinas.
- **Grasas.** La leche entera tiene un 3,5-4% de grasa, de grasa láctea que se encuentra emulsionada, constituyendo glóbulos lípidos. Cuando esta emulsión se rompe, debido a su menor densidad, los glóbulos de grasa ascienden espontáneamente y se sitúan en la superficie, constituyendo la crema o nata. (Armas Alba, 2017)
- **Vitaminas.** En la leche se encuentran prácticamente todas las vitaminas hidro y liposolubles, destacando las vitaminas B1, B2, niacina, B12 y otras del complejo B,

siendo pobre en vitamina C. Las vitaminas A y D están representadas en la grasa láctea. (Armas Alba, 2017)

La composición de la leche es importante ya que más de 6.000 millones de personas consumen leche y productos lácteos en el mundo y la mayoría de ellas vive en los países desarrollados. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), menciona que la leche líquida es el producto lácteo más consumido en todo el mundo en desarrollo. Tradicionalmente, la demanda de leche líquida es mayor en los centros urbanos y la de leche fermentada en las zonas rurales, pero los productos lácteos procesados están adquiriendo una creciente importancia en muchos países, siendo la leche de vaca la más consumida a nivel mundial.(Armas Alba, 2017)

2.3 MARCO LEGAL – NORMATIVA

2.3.1 Norma NTE/INEN 9:2012- Requisitos de la leche cruda

La Norma Técnica Ecuatoriana establece los requisitos que debe cumplir la leche cruda de vaca, destinada al procesamiento.

Requisitos organolépticos

Color. Debe ser blanco opalescente o ligeramente amarillento.

Olor. Debe ser suave, lácteo característico, libre de olores extraños.

Aspecto. Debe ser homogéneo, libre de materias extrañas.

Requisitos Fisicoquímicos

Según la norma (INEN, 2012) La leche cruda, debe cumplir con los requisitos físico-químicos que se indican en cuadro 1.

Cuadro 1. Requisitos fisicoquímicos de la leche

REQUISITOS	UNIDAD	MIN.	MAX.	MÉTODO DE ENSAYO
Densidad relativa: a 15 °C A 20 °C	-	1,029 1,028	1,033 1,032	NTE INEN 11
Materia grasa	% (fracción de masa) ⁴	3,0	-	NTE INEN 12
Acidez titulable como ácido láctico	% (fracción de masa)	0,13	0,17	NTE INEN 13
Sólidos totales	% (fracción de masa)	11,2	-	NTE INEN 14
Sólidos no grasos	% (fracción de masa)	8,2	-	*
Cenizas	% (fracción de masa)	0,65	-	NTE INEN 14
Punto de congelación (punto crioscópico) **	°C °H	-0,536 -0,555	-0,512 -0,530	NTE INEN 15
Proteínas	% (fracción de masa)	2,9	-	NTE INEN 16
Ensayo de reductasa (azul de metileno)**	h	3	-	NTE INEN 018
Reacción de estabilidad proteica (prueba de alcohol)	Para leche destinada a pateurización: No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 68 % en peso o 75 % en volumen; y para la leche destinada a ultrapasteurización: No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 71 % en peso o 78 % en volumen			NTE INEN 1500
Presencia de conservantes ¹⁾	-	Negativo		NTE INEN 1500
Presencia de neutralizantes ²⁾	-	Negativo		NTE INEN 1500
Presencia de adulterantes ³⁾	-	Negativo		NTE INEN 1500
Grasas vegetales	-	Negativo		NTE INEN 1500
Suero de Leche	-	Negativo		NTE INEN 2401
Prueba de Brucelosis	-	Negativo		Prueba de anillo PAL (Ring Test)
RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS ⁵⁾	ug/l	---	MRL, establecidos en el CODEX Alimentarius CAC/MRL 2	Los establecidos en el compendio de métodos de análisis identificados como idóneos para respaldar los LMR del codex ⁶⁾

* Diferencia entre el contenido de sólidos totales y el contenido de grasa.
 ** °C= °H · f, donde f= 0,9656
 *** Aplicable a la leche cruda antes de ser sometida a enfriamiento
 1) Conservantes: formaldehído, peróxido de hidrógeno, cloro, hipocloritos, cloraminas, lactoperoxidasa adicionada y dióxido de cloro.
 2) Neutralizantes: orina, carbonatos, hidróxido de sodio, jabones.
 3) Adulterantes: Harina y almidones, soluciones azucaradas o soluciones salinas, colorantes, leche en polvo, suero de leche, grasas vegetales.
 4) "Fracción de masa de B, W_B": Esta cantidad se expresa frecuentemente en por ciento, %. La notación "% (m/m)" no deberá usarse".
 5) Se refiere a aquellos medicamentos veterinarios aprobados para uso en ganado de producción lechera.
 6) Establecidos por el comité del Codex sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos

Fuente: Norma Técnica Ecuatoriana NTE/INEN9:2012

Contaminantes. El límite máximo para contaminantes es el que se indica en el cuadro 2

Cuadro 2. Límites máximos para contaminantes

Requisito	Límite máximo (LM)	Método de ensayo
Plomo, mg/kg	0,02	ISO/TS 6733
Aflatoxina M1, ug/kg	0,5	ISO 14674

Fuente: Norma Técnica Ecuatoriana NTE/INEN9:2012

Aceptación o rechazo. Se acepta el producto si cumple con los requisitos indicados en esta norma, caso contrario se rechaza.

2.3.2 Organización Internacional de Normalización -ISO 14674:2005

La ISO (Organización Internacional de Normalización) es una federación mundial de organismos nacionales de normalización (organismos miembros de ISO). El trabajo de preparación de las Normas Internacionales normalmente se realiza a través de los comités técnicos de ISO. Cada organismo miembro interesado en una materia para la cual se haya establecido un comité técnico tiene el derecho de estar representado en dicho comité.(ISO, 2016)

Esta Norma Internacional especifica un método para la determinación del contenido de aflatoxina M1 (AFM1) de la leche y la leche en polvo mediante un método que incluye un paso de purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad seguida de cromatografía en capa fina (IAC-TLC). El método es aplicable a la leche cruda, la leche líquida desnatada o baja en grasa y la leche en polvo. (ISO, 2016)

2.3.3 Codex Alimentarius (CODEX STAN 193-1995)

Esta Norma contiene los principios recomendados en relación con los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos; se indican también los niveles máximos y planes de muestreo relacionados de los contaminantes y las sustancias tóxicas naturales que se encuentran en los alimentos y piensos que, por recomendación de la Comisión del Codex, deben aplicarse a los productos que circulan en el comercio internacional. Esta norma comprende únicamente niveles máximos de contaminantes y sustancias tóxicas naturales que se encuentran en los piensos en los casos en que el contaminante en los piensos puede ser transferido al alimento de origen animal y que pueden ser pertinentes para la salud pública.(CODEX, 1999)

Para la aflatoxina AFM1 en leche el Codex *Alimentarius* estableció un límite máximo de 0,5 µg / kg. La contaminación de los alimentos y piensos puede suponer un riesgo para el ser humano (y/o la salud animal). Además, en algunos casos pueden tener un impacto negativo en la calidad de los alimentos y piensos. Los alimentos y piensos pueden ser contaminados por varias causas y procedimientos. Los niveles de los contaminantes presentes en los alimentos y piensos deben ser lo más bajos que razonablemente sea posible a través de buenas

prácticas, como buenas prácticas agrícolas (BPA) y buenas prácticas de fabricación (BPF) siguiendo una evaluación apropiada de riesgos. (CODEX, 1999)

2.4 AFLATOXINAS

2.4.1 Generalidades

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por cepas toxigénicas de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* los cuales aparecen como contaminantes naturales en casi la totalidad de las materias primas utilizadas en la alimentación de los animales cuando las condiciones ambientales son propicias para su desarrollo.

El nombre de las aflatoxinas hace referencia al hecho de ser biosintetizadas por el hongo *Aspergillus flavus*. La primera letra A, hace referencia al género *Aspergillus*, las tres siguientes letras FLA, debido a que proceden de las especies *flavus* y el termino TOXINA se refiere a su efecto tóxico.(Rojas, Luis Jorge et al., 2017)

Estas sustancias son altamente cancerígenas, producen toxicidad y cáncer de hígado. Se han detectado en diferentes cultivos en el campo, cosecha, transporte y almacenamiento en el hogar. Las aflatoxinas suelen designarse con letras, que se refieren a una característica física o de otro tipo del compuesto, por ejemplo, las B1 y B2 presentan fluorescencia azul y las G1 y G2, fluorescencia verde cuando se exponen a radiación ultravioleta de onda larga. Las cepas toxicógenas de *Aspergillus flavus* generalmente producen solo aflatoxina B1 y B2, mientras que las cepas toxicógenas de *Aspergillus parasiticus*, producen aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. (Bogantes-Ledezma, Pilar, 2004) . Entre las aflatoxinas, la AFB1 es la considerada como la de mayor riesgo porque es la que presenta mayor poder hepatotóxico y cancerígeno de las cuatro aflatoxinas comúnmente encontradas de manera natural en los alimentos.

La presencia de aflatoxinas está asociada, tanto a las condiciones de almacenamiento inadecuadas, como a la contaminación del producto en el campo. Los factores que afectan la contaminación de los granos incluyen la cantidad de esporas inoculadas, la tensión durante el crecimiento de las plantas, las poblaciones de insectos y ácaros, los daños causados por

otros hongos, las variedades susceptibles o resistentes de las plantas, el daño mecánico, el daño por tormenta, el daño por aves, la nutrición mineral de la planta y la temperatura ambiente. Se pueden encontrar en cualquier punto de la cadena alimentaria desde la siembra y cosecha hasta en la carne, leche y derivados, originando un grupo de enfermedades y trastornos denominados micotoxicosis, las cuales afectan tanto al hombre como a los animales.(Rojas, Luis Jorge et al., 2017)

2.4.2 Toxicología

Las aflatoxinas tienen una gran actividad cancerígena, teratogénica y mutagénica. El principal síndrome que producen es el hepatotóxico, pudiendo también provocar problemas renales. Los principales órganos afectados son: el hígado, riñón y cerebro.(Gimeno et al., 2019)

No presentan olor ni sabor, y de los 18 tipos de aflatoxinas solo 6 tienen significación como contaminantes de los alimentos: B1 B2, G1, M1 y M2. Las aflatoxinas se pueden encontrar dentro del organismo animal, ya sea en su estructura química original, transformada o bien ambas. El organismo de los animales tiene la capacidad para transformar las aflatoxinas originales en derivados de estas, los cuales pueden ser también tóxicos.(Rojas, Luis Jorge et al., 2017)

La aflatoxina B1 (AFB1) es considerada el compuesto más tóxico producido por estos hongos; en el hígado esta micotoxina es biotransformada por el citocromo P450 microsomal en su metabolito hidroxilado: la aflatoxina M1 (AFM1), La Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) ha reportado a la AFB1 y AFM1, como compuestos carcinógenos para seres humanos. La presencia de AFM1 en la leche, constituye un riesgo para la población, particularmente en niños debido a la importancia de este producto en su alimentación y a que son considerados más susceptibles a sus efectos adversos, ya que su capacidad de biotransformación de los compuestos carcinógenos es generalmente más lenta que en adultos (Landeros et al., 2012)

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, 2002), clasifica a las aflatoxinas como carcinógenas o posiblemente carcinógenas para el hombre de acuerdo con los siguientes grupos:

- Grupo 1: Agente carcinógeno en humanos. En este grupo se encuentra la AFB1
- Grupo 2B: agente posiblemente carcinógeno; la evidencia en humanos es limitada y tampoco hay suficiente evidencia con animales de experimentación. En este grupo se encuentra la AFM1

Los principales factores que determinan la severidad de los efectos de las aflatoxinas en los humanos son:

- Biodisponibilidad y toxicidad de la Aflatoxina
- Sinergismos entre micotoxinas
- Cantidad de aflatoxina ingerida diariamente en función de su concentración y de la cantidad de alimento ingerido.
- Continuidad en la ingestión del alimento contaminado.
- Peso, estado nutricional y de salud (patologías propias) del individuo.
- Edad del individuo. Los niños y los jóvenes son más susceptibles a la toxicidad de las aflatoxinas debido a una mayor variación del metabolismo basal. Ellos pueden no tener suficientes mecanismos bioquímicos para la desintoxicación.

2.4.3 Toxicocinetica

(Rojas, Luis Jorge et al., 2017) Las aflatoxinas son absorbidas en el tracto gastrointestinal debido a su alta liposolubilidad y son biotransformadas en el hígado. Aproximadamente el 80% de la dosis total de AFB1 se excreta en una semana. La AFM1 se excreta en las 48 h siguientes a la ingestión y representa el 1-4% de la AFB1 ingerida. (IARC, 2002) Las aflatoxinas tienen una gran actividad cancerígena, teratogénica y mutagénica. El principal síndrome que producen es el hepatotóxico, pudiendo también provocar problemas renales. Los principales órganos afectados son: el hígado, riñón y cerebro. Las aflatoxinas son inmunosupresoras ya que inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica

interrumpiendo la formación del ADN, ARN y proteínas en el ribosoma; la absorción de los aminoácidos se ve alterada y su retención hepática aumenta. La AFB1 requiere ser activada para producir mutaciones. La ruta de activación es la conversión de AFB1 en el metabolito electrofílico AFB1-8, 9-epóxido. La formación del epóxido requiere de la presencia de un doble enlace entre los carbonos C8-C9. La AFM1, aunque presenta el doble enlace entre los carbonos C8 y C9, es 2 veces menos tóxica que la AFB1 en cuanto a carcinogenicidad se refiere. La AFB1-epóxido presenta dos conformaciones: una endo y una exo. La forma endo posee aproximadamente 500 veces más poder mutagénico que la forma exo. Una porción de aflatoxina es activada y fijada en los tejidos hepáticos. Otras formas conjugadas solubles en agua, productos de degradación de la AFB1 y metabolitos no conjugados de esta, son excretadas en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen de forma sistémica. Eventualmente, estos residuos van a la leche, huevos, músculo y tejidos comestibles. La AFB1 es uno de esos derivados metabólicos que va a la leche contaminándola.

2.4.4 Aflatoxina AFM1 en leche

Como se ha mencionado Aflatoxina M1 (AFM1) es un metabolito hidroxilado de aflatoxina B1 (AFB1) y puede detectarse en la leche obtenida de animales domésticos que se han alimentado de cereales contaminados. (Yoshinari et al., 2016).

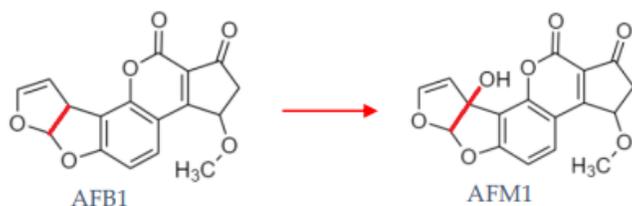


Figura 1. Ilustración de la conversión de aflatoxina B1 (AFB1) en aflatoxina M1 (AFM1)

Se utiliza la letra M de “Milk Aflatoxin”, (aflatoxinas aisladas de la leche). La cantidad de AFM1 secretada es proporcional a la cantidad de AFB1 ingerida. La tasa de conversión de AFB1 en AFM1 oscila entre 0.4 % y 3% que luego se excreta en la leche de animales lactando que han consumido alimentos contaminados con AFB1. (Landeros et al., 2012)

Aunque la actividad genotóxica de AFM1 es menor que la de AFB1, la Agencia Internacional de Investigación contra el cáncer (IARC) ha evaluado AFM1 en el grupo 2B. Para minimizar

el peligro para la salud de AFM1, algunos países han establecido límites reglamentarios para ella en la leche y los productos lácteos. La Comisión del Codex Alimentarius estableció un nivel máximo de 0,5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ AFM1 en leche. En la Unión Europea (UE), el límite máximo admisible de AFM1 en los productos lácteos es de 0,05 $\mu\text{g} / \text{kg}$ y los límites para los preparados para lactantes, la leche para lactantes y la leche de continuación son de 0,025 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que la FDA de EE. UU. ha establecido el límite legal de AFM1 en 0,5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ para productos lácteos líquidos. (Yoshinari et al., 2016)

En Ecuador la Norma NTE INEN 0009:2012 ha estandarizado parámetros físico-químicos-biológicos que debe cumplir la leche fresca para consumo humano, la misma que ha establecido un límite máximo de 0,5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de AFM1 en leche cruda. La contaminación por AFM1 en la leche cruda no presenta un problema grave de salud pública en Ecuador, sin embargo, se desarrolla programas de monitoreo y vigilancia de esta micotoxina en la leche para prevenir problemas de salud del consumidor.

Entre las propiedades de las aflatoxinas destaca su gran termo resistencia, ya que su punto de fusión está por arriba de los 200 °C. Debido a esto la AFM1 resiste a la pasteurización y la ultrapasteurización, por lo que es posible encontrarla en la leche y derivados lácteos obtenidos de animales que consumen alimentos contaminados con AFB1. Por lo anterior, la mejor prevención para evitar la contaminación con AFM1 es la de no suministrar al animal raciones contaminadas con AFB1. Los métodos de selección de granos de cereales y los descascarados y posterior separación mecánica de la cascara y el polvo del resto del cereal, resultan adecuados para una descontaminación; lo anterior se debe a que habitualmente la mayor concentración de micotoxinas ocurre en el pericarpio de los granos y en el polvo del cereal. Estas prácticas pueden ser utilizadas tanto en los alimentos destinados a los animales como para los humanos. (Rojas, Luis Jorge et al., 2017)

2.5 TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS DE ORIGEN ANIMAL

Entre los métodos analíticos clásicos y de mejor aproximación en la cuantificación de las aflatoxinas se encuentran la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), también se utiliza técnica de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)

2.5.1 Técnica Inmunoensayo ELISA

Entre los métodos inmunológicos utilizados en la medición de aflatoxinas, los más comunes son el ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) aprobado como método oficial de la AOAC se basa en la competición de unión entre la toxina no marcada de la muestra y la toxina marcada en sitios específicos de anticuerpos; la inmunoafinidad es una técnica cromatográfica basada directamente en la unión del antígeno (toxina) con el anticuerpo fijado en una columna.(Amado, 2002)

En el análisis de aflatoxinas, se suelen utilizar ELISA de competencia directa. ELISA (Figura 2). En los ensayos competitivos directos, los pocillos de la placa de microvaloración se recubren con un anticuerpo específico para el analito bajo análisis. Después de la adición de la muestra, el analito compite con un análisis marcado con enzima para unirse con un número restringido de anticuerpos. Después de la incubación, los compuestos no unidos se eliminan por lavado y se agrega un sustrato cromogénico para el desarrollo del color. La medición se realiza fotométricamente en un lector ELISA. La actividad enzimática en cada pocillo es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxinas en la muestra, es decir, cuanto menor es la absorbancia, mayor es la concentración de aflatoxinas. Esto sucede debido a la mayor concentración de micotoxinas, menos reaccionará el conjugado (analito marcado con enzima) con el anticuerpo unido, lo que revelado del color.(Vaz et al., 2020)

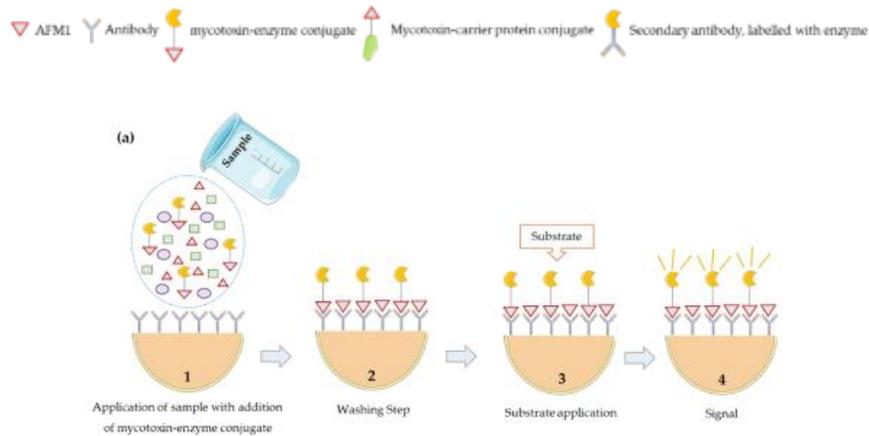


Figura 2. Principio ELISA competencia directa

2.5.2 Técnicas Inmunocromatograficas

En los últimos años se ha desarrollado lo ensayo inmunocromatográfico rápido basado en nanopartículas de oro coloidal de anticuerpos específicas las cuales han sido de gran utilidad para la detección rápida de medicamentos de uso veterinario en los alimentos de origen animal.

El ensayo inmunocromatográfico de un solo paso con nanopartículas de oro se ha utilizado ampliamente en ciertos campos Este método es rápido y conveniente de usar y requiere pocos equipos. (Yoshinari et al., 2016)

Este tipo de ensayo permite manejar gran número de muestras debido a su bajo costo y facilidad operativa, siendo un ensayo rápido para la evaluación cualitativa y presuntiva de los antibióticos en los alimentos de origen animal. Aunque su especificidad y sensibilidad depende del antibiótico a analizar, siempre se tendrá que utilizar métodos de confirmación los cuales permiten obtener información adicional para la cuantificación e identificación inequívoca del analito.

2.5.2.1. Método rápido – Rapid Test

Esta técnica está basada en nanopartículas de oro coloidal de anticuerpos específicas las cuales han sido de gran utilidad para la detección rápida de medicamentos y contaminantes de alimentos de origen animal. (Yu et al., 2018)

A continuación, mostraremos una de las técnicas rápidas y poco conocidas en la cual utilizaremos método rápido producido Shenzhen Bioeasy Biotechnology (Aflatoxin M1 Quantitative Rapid test strip in milk (figura3), los cuales se basan en la tecnología inmunocromatográfico de oro coloidal. Ensayo Inmunocromatográfico (kit rápido), esta prueba rápida se utiliza para la detección cuantitativa de aflatoxina M1. Se tarda unos 10 minutos en realizar una prueba. (Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., n.d.)



Figura 3. Componentes del Kit rápido para Aflatoxina M1

Información de rendimiento

Rango lineal	150 - 600 ppt
Sensibilidad	150 ppt
Límite de detección	200 ppt

1ppt = 0,001 µg / kg

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

- leche cruda
- Envases estériles de polipropileno de 50 ml con pastilla conservante de bronopol
- kit de prueba rápida de (Aflatoxin M1 Quantitative Rapid test strip in milk) contiene:
12 tubos de ensayo, cada uno con una tira de 8 micropocillos de reactivo rojo y 8 tiras reactivas.
25 ml de diluyente de muestra
- Micropocillos con estándar de Aflatoxina M1 0,500 ug/Kg
- Gradilla para micropocillos
- Micropipeta de 20 - 200 ul
- Puntas amarillas de 20 – 200 ul descartables
- Guantes de nitrilo

3.2 EQUIPO

- Cooler con gel refrigerante
- Incubadora modelo MiniT-N serial No YR-Mini-T-5633
- Refrigerador de 4- 8 °C
- Lector de tiras reactivas YR-10 con ID card con la curva cuantitativa de 150 – 600 ppt (0,150 – 0,600 ug/Kg)

3.3 METODOLOGÍA

3.3.1 Recolección de las muestras

Se seleccionó un productor lechero de la parroquia de Cotogchoa del cantón Mejía de la provincia de Pichincha, del cual fueron tomadas tres muestras representativas de 0,5 L de un volumen total 1500 litros de leche cruda en el área de recepción. Para la toma de muestras fue utilizado como referencia el instructivo INT/CL/010 “toma de muestras de leche cruda y suero de leche” utilizado por la agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (Agrocalidad).

Las muestras fueron tomadas de tarros de acero inoxidable en los cuales se introdujo un agitador metálico hasta el fondo del tanque para lograr una distribución homogénea, cada tanque fue agitado 6 veces por aproximadamente 2 minutos; con la ayuda de un cucharón se extrae la muestra en recipientes herméticos, a continuación fueron re-embasadas a frascos estériles de polipropileno con conservante bronopol se cierra herméticamente el envase, se rotula con la información necesaria y se coloca en el cooler para ser trasladadas a las instalaciones donde se realizará el análisis de las muestras. (Flores et al., 2020)

3.3.2 Conservación de las muestras

Las muestras al llegar a las instalaciones de Sudmilk – Ecuador son almacenadas en el refrigerador a 4°C, estas tienen una duración de 15 días en refrigeración y 7 días al ambiente.

3.3.3 Tratamiento de las muestras

Para verificar la sensibilidad del equipo se elaboró muestras patrón a las cuales se agregaron distintas concentraciones del analito a cuantificar a partir de un estándar positivo de 1,7 ug/kg para establecer resultados positivos en tres diferentes puntos 0,250 ug/kg, 0,350 ug/kg y 0,550 ug/kg de AFM1.

Las muestras se identificaron de la siguiente manera.:

Cuadro 3. Identificación de las muestras

ID de la muestra	Concentración
Bm	Muestra de leche cruda
C_{1m}	Muestra de leche cruda con 0,250 ug/kg de AFM1
C_{2m}	Muestra de leche cruda con 0,350 ug/kg de AFM1
C_{3m}	Muestra de leche cruda con 0,550 ug/kg de AFM1

3.3.4 Análisis de aflatoxina M1 en leche por el método rápido

Las muestras almacenadas fueron sacadas del refrigerador, se las deja al ambiente por algunos minutos para empezar el proceso de análisis por la prueba rápida.

Para el análisis de las muestras utilizamos el Milk Rapid Test Kit lote 21M0204D00301C, se sacó los micropocillos el cual contiene un reactivo rojo con nanopartículas de oro coloidal de anticuerpos específicos y se coloca en la gradilla, de cada una de las muestras pipeteamos 100 µL lo cuales son adicionados en el micropocillo el cual contiene 100 µL de diluyente de muestra se mezcla bien pipeteando arriba y abajo de 5 a 6 veces. Se programa la incubadora a 40 ± 2 ° C y se incuba las muestras por 2 minutos, pasado ese tiempo se insertó la tirilla en el micropocillo después de la primera incubación, se realiza una segunda incubación por otros 8 minutos a 40 ± 2 °C. Sacamos la varilla de nivel del micropocillo y retiramos la almohadilla de la muestra del extremo inferior.

Para leer el resultado primero se introduce el ID card en el lector YR-10, se carga la curva de calibración de AFM1 150 – 600 ppt, antes de empezar la lectura de las muestras leemos una tirilla control de $0,90 \pm 0,1$ con la cual verificamos que el equipo este leyendo correctamente. (Anexo 3) Seleccionamos la opción “prueba cuantitativa” se identifica la muestra (ID

muestra), la fecha, el ID del operador e insertamos la tirilla dentro del lector, damos click en la opción “prueba” y esperamos el resultado.

3.3.5 Análisis de muestras por método ELISA

Las muestras de leche cruda analizadas por la prueba rápida fueron llevadas en un cooler al laboratorio LASSA para ser ensayadas por método tradicional ELISA, las muestras fueron envasadas en frascos de 50 ml de polipropileno con conservante bronopol e identificadas de acuerdo con lo solicitado por el laboratorio.

3.3.6 Procesar y comparar los datos obtenidos del método rápido y método tradicional mediante el software estadístico Statgraphics Centurion.

Una vez obtenidos todos los datos de los análisis del método de kit de prueba rápida (Aflatoxin M1 Quantitative Rapid test strip in milk) y el método de ELISA, se procederán a analizar mediante software Statgraphics Centurion.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Toma de muestras

En la figura 4 se adjunta imágenes del proceso de muestreo según instructivo INT/CL/010 “toma de muestras de leche cruda y suero de leche” utilizado por Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario -AGROCALIDAD involucrados en el monitoreo y control de leche cruda.



Figura 4. Proceso de muestreo y conservación de muestra

Para transportar y conservar las muestras usamos frascos de polipropileno que contiene un comprimido de entre 41 – 50 mg de Bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) el cual ayuda a mantener las características físico – químicas de la leche retardando el crecimiento bacteriano durante el transporte de las muestras, proporcionando a las muestras un tiempo de conservación de 15 días en refrigeración y 7 días al ambiente.

4.2 Análisis de muestras de leche cruda utilizando prueba rápida de Shenzhen Bioeasy Biotechnology (Aflatoxin M1 Quantitative Rapid test strip in milk)

Los resultados obtenidos de las muestras se exponen en los cuadros 3, 4, 5 y 6 donde se encuentran los datos de la muestra de leche cruda que fue tomada como blanco (Bm), los resultados de las muestras patrones a las cuales se agregaron distintas concentraciones del analito a cuantificar en tres puntos 0,250 ug/kg (C_{1m}) 0,350 ug/kg (C_{2m}) y 0,550 ug/kg (C_{3m}).

Cuadro 3. Resultados obtenidos con Kit prueba rápida (AFM1) muestra de leche cruda

Ítem de Prueba	ID muestra	Resultado ppt	Resultado ug/Kg	Promedio ug/Kg
AFM1(150-600ppt)	Bm1	<150.00 ppt	< 0,150 ppb	< 0,150 ppb
AFM1(150-600ppt)	Bm2	<150.00 ppt	< 0,150 ppb	
AFM1(150-600ppt)	Bm3	<150.00 ppt	< 0,150 ppb	

El resultado < 0,150 ppb expone que la cantidad de Aflatoxina que contiene la muestra de leche utilizada como blanco se encuentra por debajo de la sensibilidad de la prueba 0,150 ppb y por debajo del límite de detección de la prueba rápida (0,200 ppb).

Cuadro 4. Resultados con Kit prueba rápida (AFM1) muestra control (C1) de leche cruda 0,250 ppb.

Ítem de Prueba	ID muestra	Resultado ppt	Resultado ug/Kg	Promedio ug/Kg
AFM1(150-600ppt)	C _{1m1}	251,35 ppt	0,251 ppb	0,248 ppb
AFM1(150-600ppt)	C _{1m2}	246,49 ppt	0,246 ppb	
AFM1(150-600ppt)	C _{1m3}	248,23 ppt	0,248 ppb	

Cuadro 5. Resultados con Kit prueba rápida (AFM1) muestra control (C2) de leche cruda 0,350 ppb

Ítem de Prueba	ID muestra	Resultado ppt	Resultado ug/Kg	Promedio ug/Kg
AFM1(150-600ppt)	C _{2m1}	345,25 ppt	0,345 ppb	0,348 ppb
AFM1(150-600ppt)	C _{2m2}	351,86 ppt	0,352 ppb	
AFM1(150-600ppt)	C _{2m3}	347,70 ppt	0,348 ppb	

Cuadro 6. Resultados con Kit prueba rápida (AFM1) muestra control (C3) de leche cruda 0,550 ppb.

Ítem de Prueba	ID muestra	Resultado ppt	Resultado ug/Kg	Promedio ug/Kg
AFM1(150-600ppt)	C _{3m1}	>555.00 ppt	0,555 ppb	0,552 ppb
AFM1(150-600ppt)	C _{3m2}	>554.79 ppt	0,553 ppb	
AFM1(150-600ppt)	C _{3m3}	>548.10 ppt	0,548 ppb	

En el año 2020 (Puga-Torres et al., 2020) realizó una investigación cuyo objetivo era determinar aflatoxina M1 en leche cruda, las concentraciones fueron medidas con pruebas rápidas basada en inmunocromatografía de flujo lateral (LFIA), el cual utiliza anticuerpos monoclonales, con este ensayo se identificó que existe presencia de aflatoxina M1 en muestras de leche de diferentes provincias del Ecuador; se obtuvo un promedio de aproximadamente 0,1256 µg/Kg , valores similar al encontrado en la muestra utilizada como blanco. El estudio determinó que 59,3 % de las muestras contienen cantidades de aflatoxina menores 0,05 µg/Kg las cuales están por debajo de los niveles permitido por la legislación Ecuatoriana (0,5 µg/Kg) mientras que el 1,9% están por encima del límite.

4.3 Análisis de muestras de leche cruda analizadas por método tradicional ELISA en laboratorio externo.

En el cuadro 7 se muestra los resultados de leche cruda reportados por el laboratorio LASA realizados mediante el método tradicional ELISA. (Anexo 2)

Cuadro 7. Resultados laboratorio LASA

ID muestra	Parámetro analizado	Resultado ppb	Método de análisis
Leche cruda	Aflatoxina M1	0,135 ppb	PEE.LASA.MB.38 MICROELISA
Leche cruda +Aflatoxina 0,250 ppb		0,254 ppb	
Leche cruda +Aflatoxina 0,350 ppb		0,325 ppb	
Leche cruda +Aflatoxina 0,550 ppb		0,565 ppb	

Con el método ELISA la muestra de leche cruda utilizada como blanco (Bm1) da un resultado de 0,135 ppb, a diferencia del resultado obtenido por el método rápido con un valor de “< 0,150 ppb”, esto se debe a que el límite de detección de la prueba de ELISA es de 0,125 ppb lo que se encuentra por debajo del límite de detección del método rápido.

4.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software Statgraphis Centurion con un nivel de significancia de $P \leq 0,05$ con el fin de determinar si existe alguna diferencia entre los datos.

En las figuras 5 y 6 se muestra los histogramas de la evaluación de la distribución normal de los datos obtenidos en el análisis experimental con el kit de prueba rápida, así como los datos conseguidos del laboratorio que realizó el análisis de ELISA. Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk obteniendo un valor de *P-value* 0,053 ($p \leq 0,05$) para el análisis de la prueba de aflatoxina M1 con kit rápido, mientras que para la prueba ELISA se obtuvo un *P-value* 0,031 ($p \leq 0,05$) lo que demuestra que los datos de las pruebas no siguen una distribución normal, para lo cual se utilizó pruebas adicionales no paramétricas.

Cuadro 8: Test de Normalidad Aflatoxina M1 kit rápido

<i>Test</i>	<i>Statistic</i>	<i>P-Value</i>
Shapiro-Wilk W	0,844644	0,0528352

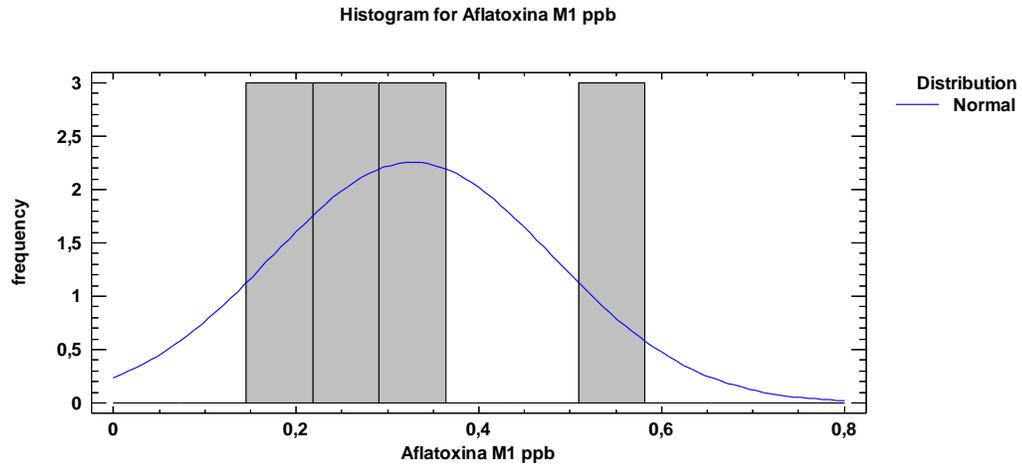


Figura 5. Histograma Aflatoxina M1 kit rápido

Cuadro 9: Test de Normalidad Aflatoxina M1 MicroElisa

<i>Test</i>	<i>Statistic</i>	<i>P-Value</i>
Shapiro-Wilk W	0,846826	0,0310621

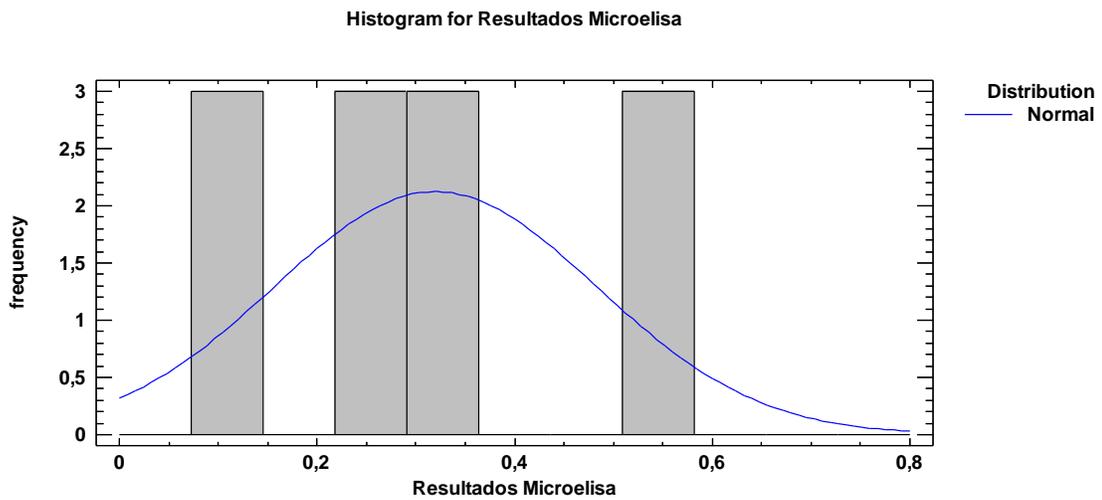


Figura 6. Histograma Aflatoxina M1 MicroElisa

Se utilizó la prueba de Mann-Whitney (Wilcoxon) con el cual comparamos las medias de los resultados obtenidos con el kit de prueba rápida de (Aflatoxin M1 Quantitative Rapid test strip in milk) y los datos del análisis por el método ELISA de AFM1 en leche cruda, se obtuvo una *P-value* 0,977 la cual es mayor $P > 0,05$; con la ayuda del diagrama de caja y bigote se observa que las medianas de las dos técnicas usadas son similares, así como la media entre ellas lo que denota que no existe diferencia significativa entre los datos, aceptando la hipótesis nula.

Cuadro 10. Prueba Mann-Whitney (Wilcoxon) comparación de método rápido y método tradicional.

Comparison of Medians

Median of sample 1: 0,298

Median of sample 2: 0,2895

Mann-Whitney (Wilcoxon) W-test to compare medians

Null hypothesis: median1 = median2

Alt. hypothesis: median1 NE median2

Average rank of sample 1: 12,5

Average rank of sample 2: 12,5

W = 72,0 P-value = 0,976864

Do not reject the null hypothesis for alpha = 0,05.

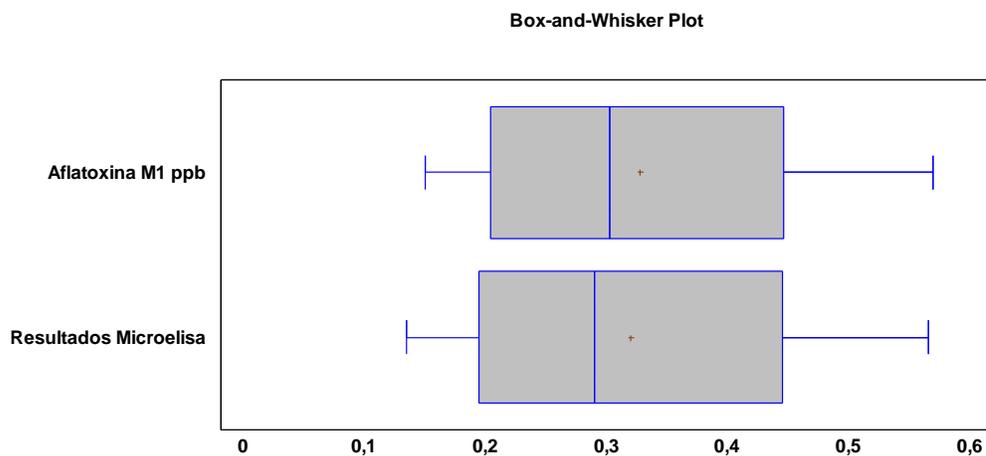


Figura 7. Diagrama de caja y bigote prueba Mann-Whitney (Wilcoxon)

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

El muestreo mediante el instructivo INT/CL/010 “toma de muestras de leche cruda y suero de leche” fue efectivo para la toma de muestra y transporte desde el centro de acopio hasta el laboratorio garantizando la calidad de las muestras para evitar que se afecte los resultados de los análisis.

Mediante el estudio se pudo determinar de forma cuantitativa la cantidad de aflatoxina AFM1 presente en las muestras de leche cruda, utilizando una prueba rápida de Shenzhen Bioeasy Biotechnology (Aflatoxin M1 Quantitative Rapid test strip in milk) cuyos resultados fueron comparados con los obtenidos con los datos obtenidos de un método tradicional ELISA realizado en un laboratorio externo.

El análisis estadístico realizado a un nivel de significancia del 95 % ($p \leq 0,05$) mostró que los resultados obtenidos a través de los dos métodos no presentan diferencias significativas, demostrando que la prueba rápida es efectiva para detectar aflatoxina AFM1 siendo capaz de proveer resultados confiables en sus rangos de sensibilidad.

5.2 RECOMENDACIONES

Si no se cuenta con el instructivo INT/CL/010 para la toma de muestras, una alternativa para el muestreo es usar la Norma Técnica Ecuatoriana NTE/INEN- ISO 707 “Leche y productos lácteos. Directrices para la toma de muestras”, con la cual se puede garantizar la toma de muestra en lugares tales como: predios o granjas, centros de acopio, sitios de almacenamiento o plantas procesadoras,

La prueba rápida de Shenzhen Bioeasy Biotechnology (Aflatoxin M1 Quantitative Rapid test strip in milk) puede ser utilizada como soporte para control de monitoreos de las entidades de control así como la industria láctea, para identificar cuantitativamente la contaminación con aflatoxina M1 en las granjas lecheras de forma rápida garantizando la inocuidad de la leche cruda; sin embargo para inspecciones más exhaustivos se recomienda utilizar el método tradicional de ELISA o el método cromatográfico (HPLC) debido a la sensibilidad que estos poseen.

Para evitar falsos positivos durante el análisis, al momento de **sacar** la varilla del micropocillo se recomienda retirar inmediatamente la almohadilla de la muestra del extremo inferior para así detener la reacción antes de introducir la varilla en el lector.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

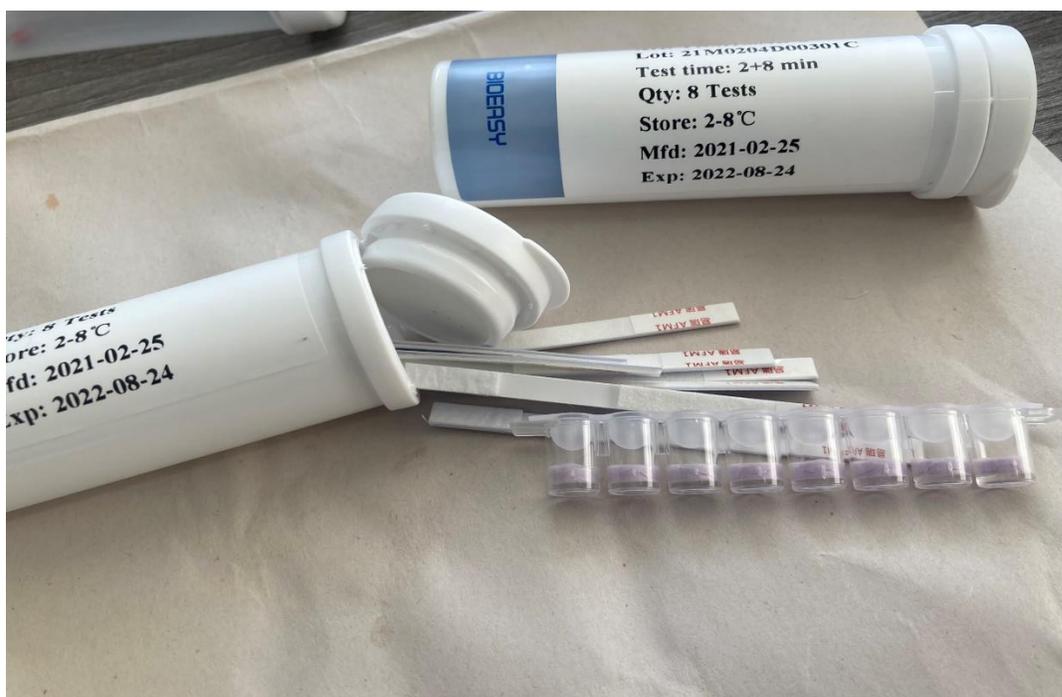
- Amado, M. A. (2002). *Metodos inmunologicos y determinación de aflatoxinas en alimentos, Ventajas y desventajas. Figura 1*, 283.
- Armas Alba, S. (2017). *Determinación de parámetros fisicoquímicos en leche*.
[https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/6815/Determinacion de parametros fisicoquimicos en leche.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/6815/Determinacion%20de%20parametros%20fisicoquimicos%20en%20leche.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Bogantes-Ledezma, Pilar, et al. (2004, October). *Aflatoxinas*.
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0001-60022004000400004&script=sci_arttext&tlng=en
- CODEX. (1999). Norma General Del Codex Stan 193-1995, Para Los Contaminantes Y Las Toxinas Presentes En Los Alimentos Y Piensos. In *Codex Stan 193_1995*.
- Flores, J., García, P., Campos, C., & Moreno, C. (2020). Agrocalidad - Laboratorio De Control De Calidad De Leche. In *Agrocalidad*.
- Gimeno, A., Gimeno, A., Nutrients, S., Way, C., Compostos, A., Las, A., La, C., Las, T., Aflatoxina, D. E. L. A., Del, D., Animal, O., Afb, L., Afm, L., La, E., Afb, C. D. E., Afm, L. A. C. D. E., En, E., & Leche, L. A. (2019). Aflatoxina M1 en la Leche . Riesgos para la Salud Pública , Prevención y Control. *SMUV- Veterinaria - Montevideo*, 55, 52–56.
- IARC. (2002). *AFLATOXINS (IARC Summary & Evaluation, Volume 82, 2002)*.
<https://incem.org/documents/iarc/vol82/82-04.html>
- INEN, I. E. de N.-. (2012). *Instituto ecuatoriano de normalización*.
- ISO. (2016). *ISO 14674:2005(en), Milk and milk powder — Determination of aflatoxin M1 content — Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by thin-layer chromatography*. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:14674:ed-1:v1:en>
- Landeros, P., Noa, M., López, Y., González, D. G., Noa, E., Real, M., Juárez, C., & Medina, M. S. (2012). *Niveles de aflatoxina M1 en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara - México*. 34(1), 40–45.
- Marañón, J. A. (2017). Contaminación por micotoxinas de la leche y derivados lácteos. *Quehacer Científico En Chiapas* 12 (1) 2017.

- Puga-Torres, B., Salazar, D., Cachiguango, M., Cisneros, G., & Gómez-Bravo, C. (2020). Determination of aflatoxin M1 in raw milk from different provinces of Ecuador. *Toxins*, 12(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/toxins12080498>
- Rojas, Luis Jorge, R., Gutiérrez Tolentino, R., Orantes Zebadua, M. A., Cruz, A. M., San, R., Km, F., Ejido, C., Zapata, E., Gutiérrez, T., & Chiapas, M. (2017). Contaminación por micotoxinas de la leche y derivados lácteos Contamination by micotoxins of milk and milk products. *Quehacer Científico En Chiapas*, 12(1), 90–101.
- Saraguro-Aguilar, A. (2019). Facultad de ciencias químicas y de la salud carrera de bioquímica y farmacia [Universidad Técnica de Machala]. In (*Bachelor's thesis, Machala: Universidad Técnica de Machala*). [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/16242/1/E-11896_PALADINES TENE ANDREA CAROLINA.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/16242/1/E-11896_PALADINES_TENE_ANDREA_CAROLINA.pdf)
- Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., L. (n.d.). *Aflatoxin M1 Quantitative Rapid test strip in milk* (Issue 2).
- Vaz, A., Cabral Silva, A. C., Rodrigues, P., & Venâncio, A. (2020). Detection methods for aflatoxin m1 in dairy products. *Microorganisms*, 8(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020246>
- Yoshinari, T., Ohnishi, T., & Terajima, J. (2016). Evaluation of four commercial kits based on immunochromatography for screening aflatoxin M1 in milk. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 57(3), 76–79. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.57.76>

ANEXOS

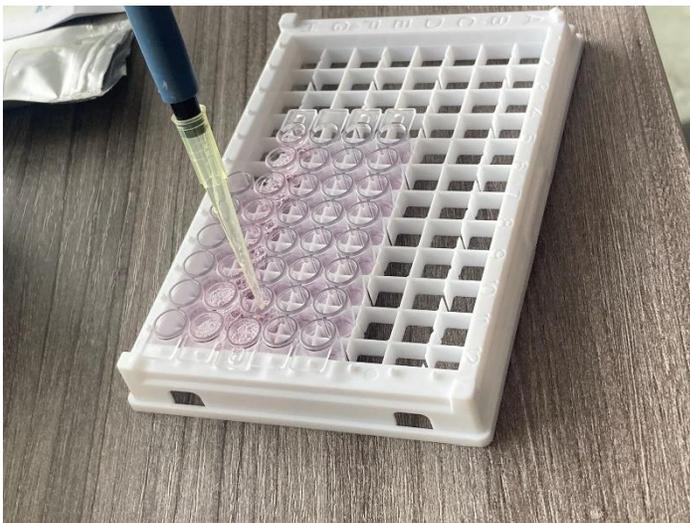
ANEXO 1

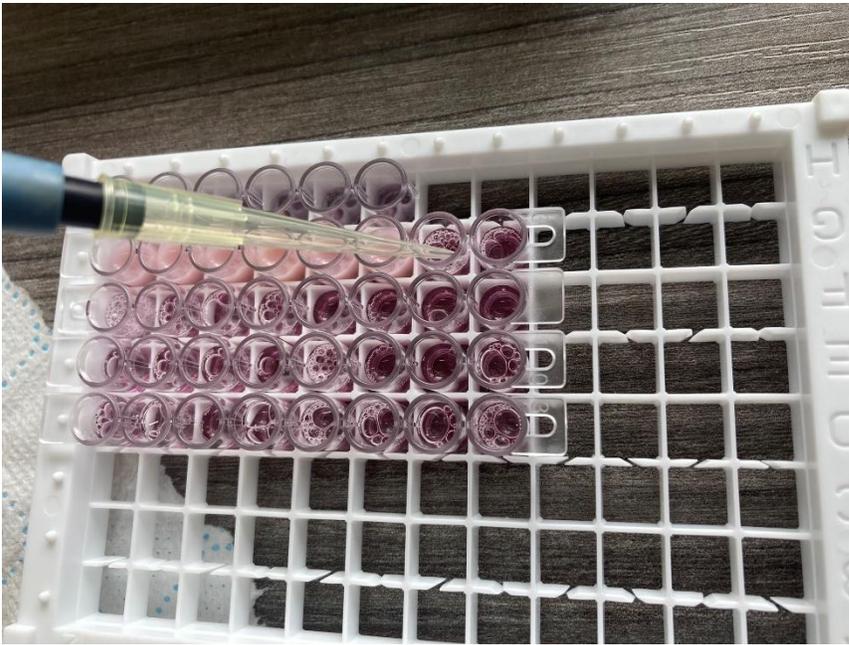
Componentes del Kit rápido

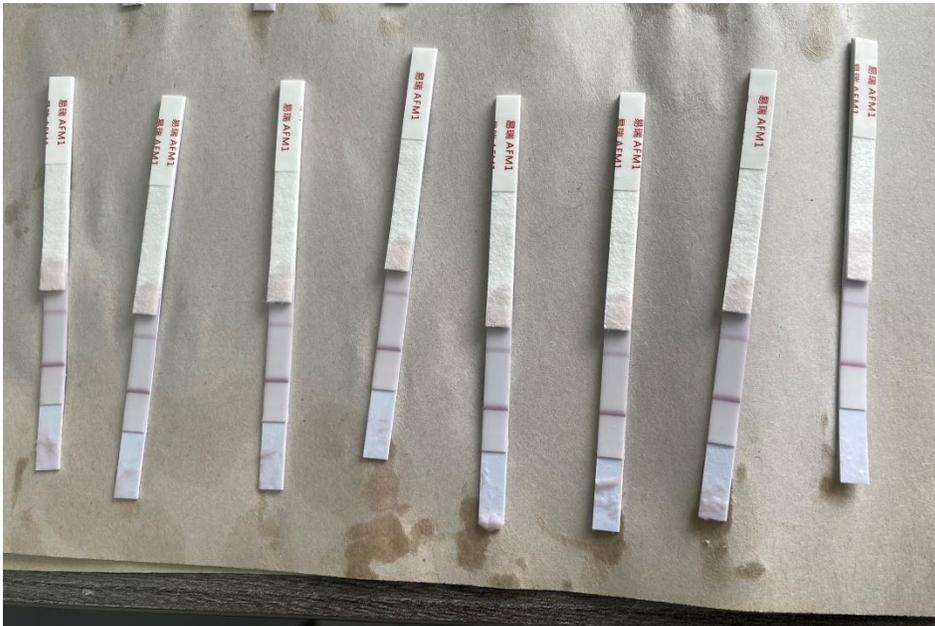


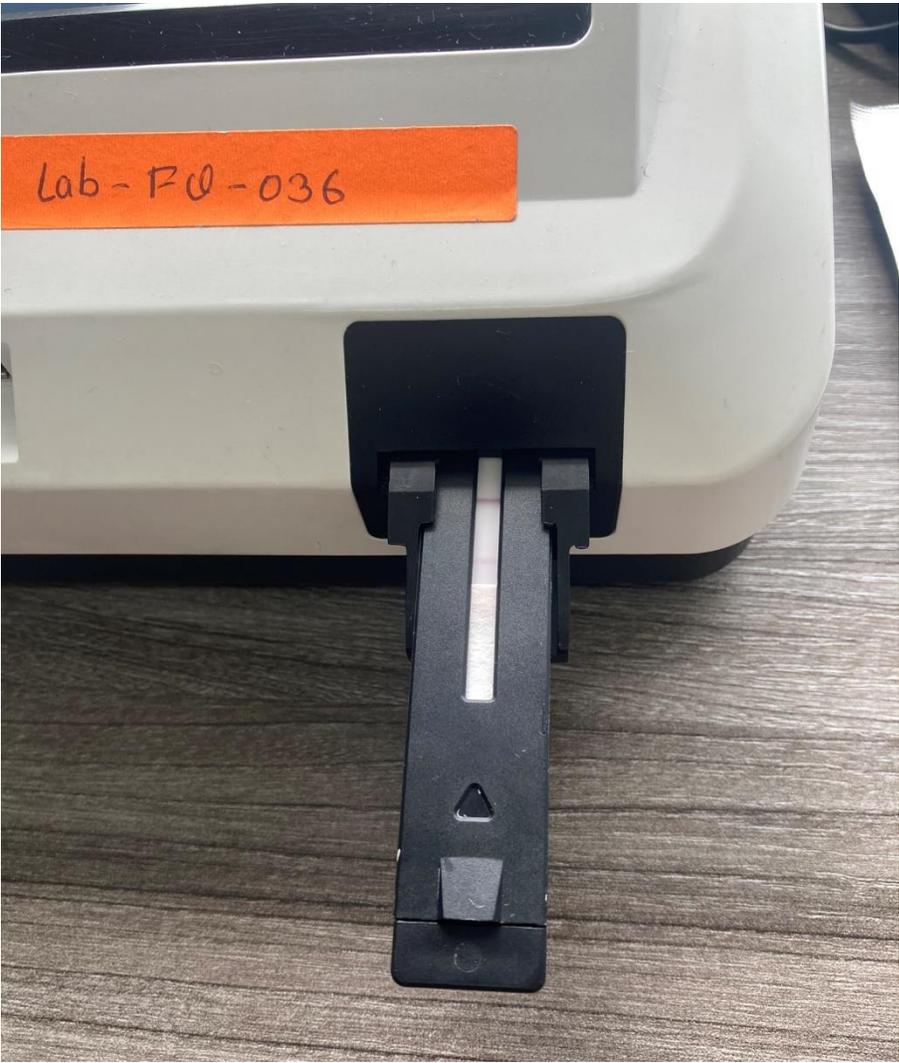
ANEXO 2

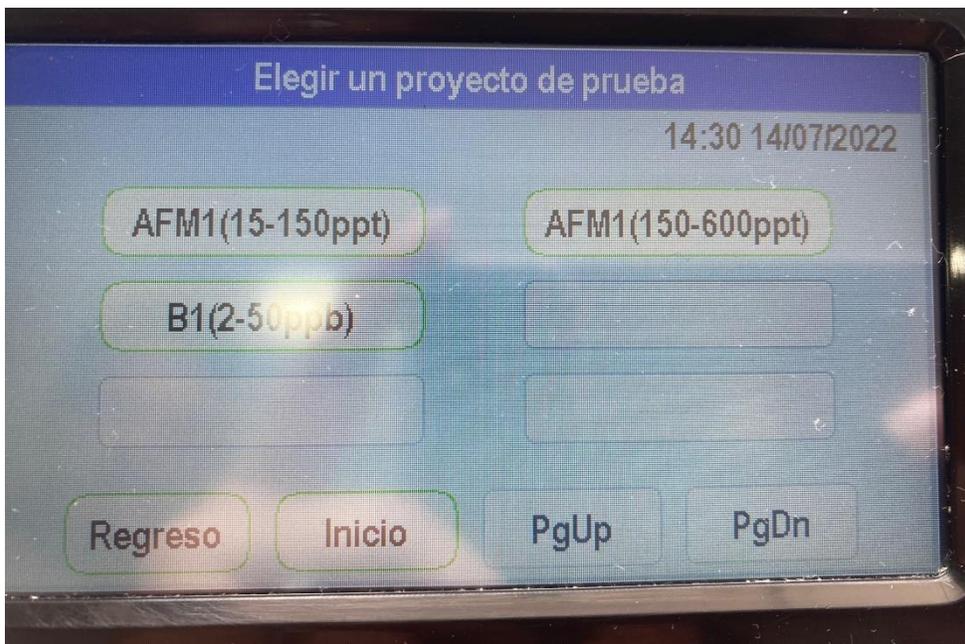
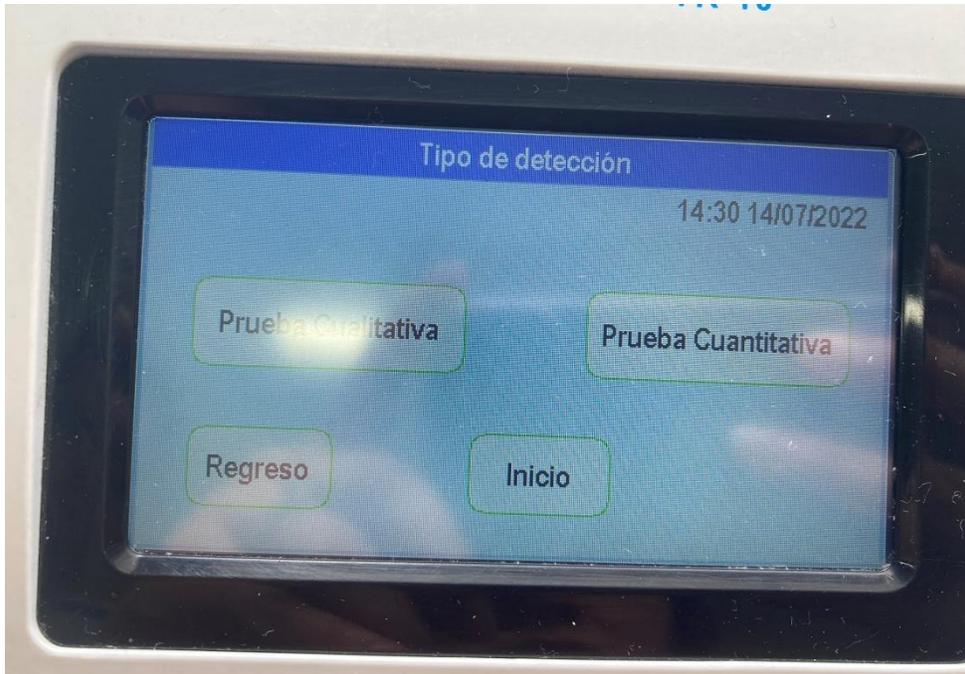
Análisis de muestras de leche cruda utilizando prueba rápida de Shenzhen Bioeasy Biotechnology











BIOEASY

YR-10

Bioeasy Ingresar información de muestra

Prueba item: AFM1(150-600ppt) 14:34 14/07/2022

choice item: AFM1(150-600ppt) AFM1(150-600ppt)

ID de muestra: m1

Lote NO.: 21M0204D00301C

ID de operador: jup

YR-10

Cuenta regresiva 14:46 14/07/2022

Prueba en progreso...

60%

***No se mueva durante la prueba**

BLUEHSY
YR-10

Prueba item	AFM1(150-600ppt)	
ID de muestra	c2	16:34 14/07/2022
Resultado	266.61 ppt	
Proporción	1.454	
Lote NO.	21M0204D00301C	
ID de operador	up	
Fecha	14/07/2022 16:34	

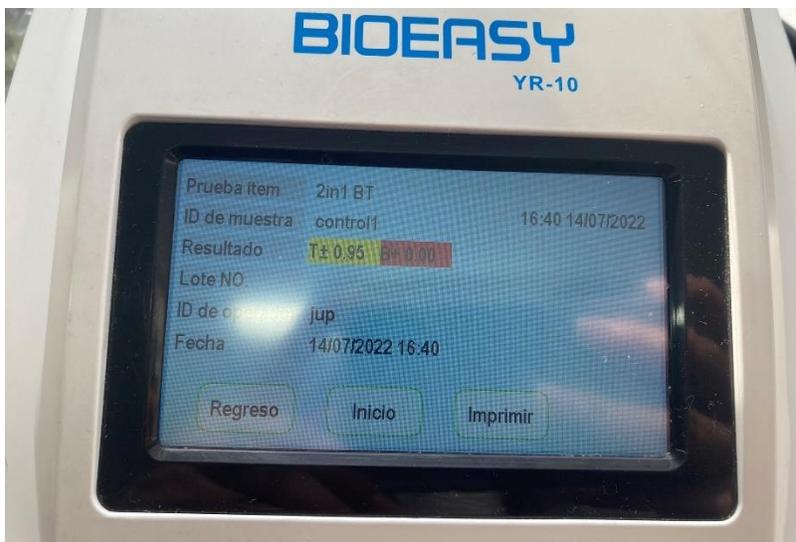
Regreso

Inicio

Imprimir

ANEXO 3

Resultado verificación tirilla control



Aflatoxin M1 Quantitative Rapid test strip in milk

Order Code: YRM1004D-3

Introduction

This rapid test is used for quantitative detection of Aflatoxin M1 in milk based on the colloidal gold immunochromatography technology. It takes about 10mins for one test.

Application

Raw milk

Performance Information

Linear range	150-600ppt
Sensitivity	150ppt
Limits of detection	200ppt

Storage and Shelf Life

Storage: Store at 2 - 8°C. Do not freeze. Keep away from direct sunlight, moisture and heat.
Shelf Life: 18 months.

Test Kit Components

- 12 test tubes, each containing 1 strip of 8 red reagent microwells and 8 dipsticks.
- 1 bottle of sample diluent
- 1 instruction manual.
- 1 quantitative curve ID card

Materials Required but not provided (available from Bioeasy)

- Special Matched Reader: **YR-10 Test Strip Reader**
- Timer, incubator, single channel pipette (20-200µL).

Test Procedure

(Before testing, check whether the instrument has imported the curve corresponding to the batch of products. If not imported, please insert the ID card of the corresponding batch of the product, then enter the "setting" interface, enter the password "1234", select "Load", and press "Load" to complete the update of the product curve of the new batch. If imported, please follow the following steps directly.)

- Pipette 100µL sample dilution into the reagent microwell first, and then add 100µL milk sample. Mix well by pipetting up and down 5 - 6 times.
- Incubate 2mins at 40 ± 2°C.
- Insert the dipstick into the microwell after first incubation. Incubate another 8mins at 40 ± 2°C.
- Take out the dipstick from the microwell and remove the sample pad at the lower end and then read the result within 2 mins.

[Note: After removing the sample pad at the lower end, the reading should be carried out

immediately (the reading of the results should be completed in 2mins). The interpretation results beyond the time limit are for reference only.]

Brief Operating Procedures of YR-10 Reader

- Connection: Connect the power cord;
- Turn on: Turn on the power switch on the left side of the instrument.
- Select "Test" and enter the sample detection interface.
- Select "Quantitative" and enter the quantitative detection interface.
- Select "AFM1 (150 - 600 ppt)" and enter the detection interface of AFM1.
- Click on "Test", the slot in the lower right corner of the instrument will automatically extend. Take out the cassette and insert the test strip, and the cassette should be pushed to the end of the slot.
- Click on "Test", and the slot will automatically enter and scan the test strip. Then the corresponding calculation results will display on the screen.

Precautions

- Do not mix use reagent microwells, dipsticks and curve ID card from different lots.
- Store the kit at 2 - 8°C cool and dry place. Return the kit to room temperature before use, but avoid prolonged exposure to humid environments and light.
- The test strip and reagent microwells are disposable. Please do not touch the white film surface in the center of the test strip.
- The quantitative linear range of this product is 150 - 600 ppt, and the displayed range of values is 100-600ppt
- After the second incubation, read the result directly within 2 min. The results are invalid after more than 2mins.
- When the reader detects that the recording memory is nearly insufficient, please export the test data in time, and then clean up the test data to avoid the lack of memory of the reader and affect the data storage.
- This product is only used for preliminary screening, and the final result shall be subject to the official arbitration detection methods.

Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd.

ADD: No.2-1 Liuxian 1st Road, Xin'an Sub-District, Baoan District, Shenzhen, Guangdong Province, China, 518101

TEL: +86-4001111126 /+86-755-27948546

FAX: +86-755-27948417

Email: info@bioeasy.com

Web: www.bioeasy.com
V20-12-15

ANEXO 4

Resultados método ELISA



INFORME DE RESULTADOS

INF. LASA 25-07-22-RS04091
ORDEN DE TRABAJO No. 22-3-483

INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE		
SOLICITADO POR: JOHANNA UTRERAS	DIRECCIÓN: AV. ECUATORIANA OE 5-59 Y AMADEO IZQUIETA	TELÉFONO: 0995657077
TIPO DE MUESTRA: LECHE Y DERIVADOS	PROCEDENCIA: PLANTA	
FECHA DE CAD.: 26-07-2022	FORMA DE CONSERVACION: REFRIGERACIÓN	
NOMBRE DEL PRODUCTO: LECHE CRUDA (Bm1)		
INFORMACIÓN DEL LABORATORIO		
MUESTREO POR: SOLICITANTE	FECHA MUESTREO: N.A.	INGRESO AL LABORATORIO: 18-07-2022
FECHA DE ANÁLISIS: 18-07-2022/ 22-07-2022	FECHA DE ENTREGA: 25-07-2022	
COD. MUESTRA: 22-9978	REALIZACIÓN DE ENSAYOS: LABORATORIO	

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

PARÁMETRO ANALIZADO	RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO DE ANÁLISIS
AFLATOXINA M1	0.135	ppb	PEE.LASA.MB.38 MICROELISA

Mcb. David Bonifaz
JEFE DE DEPARTAMENTO

Elaborado por: Estefanía Fienco
Prohibida la reproducción parcial o total por cualquier medio sin permiso por escrito del laboratorio.
LASA se responsabiliza exclusivamente del resultado correspondiente a los ensayos en la muestra recibida en el laboratorio, por el contrario, no se responsabiliza de la información proporcionada por el cliente asociada a la muestra así como sus datos descriptivos.
El laboratorio se compromete con la Imparcialidad y Confidencialidad de la información y los resultados (la aceptación de este informe implica la aceptación de la política relativa al tema y declarada en www.laboratoriolasa.com)
Los criterios de conformidad serán emitidos solamente si el cliente lo solicita por escrito.

1 de 1

INFORME DE RESULTADOS

INF. LASA 25-07-22-RS04093
ORDEN DE TRABAJO No. 22-3483

INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE		
SOLICITADO POR: JOHANNA UTRERAS	DIRECCIÓN: AV. ECUATORIANA OE 5-59 Y AMADEO IZQUIETA	TELÉFONO: 0995657077
TIPO DE MUESTRA: LECHE Y DERIVADOS	PROCEDENCIA: PLANTA	
FECHA DE CAD.: 26-07-2022	FORMA DE CONSERVACION: REFRIGERACIÓN	
NOMBRE DEL PRODUCTO: LECHE CRUDA + AFLATOXINA M1 (C1)		
INFORMACIÓN DEL LABORATORIO		
MUESTREO POR: SOLICITANTE	FECHA MUESTREO: N.A.	INGRESO AL LABORATORIO: 18-07-2022
FECHA DE ANÁLISIS: 18-07-2022/ 22-07-2022		FECHA DE ENTREGA: 25-07-2022
COD. MUESTRA: 22-9980	REALIZACIÓN DE ENSAYOS: LABORATORIO	

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

PARÁMETRO ANALIZADO	RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO DE ANÁLISIS
AFLATOXINA M1	0.254	ppb	PEE.LASA.MB.38 MICROELISA



Mcb. David Bonifaz
JEFE DE DEPARTAMENTO

Elaborado por: Estefanía Fienco
Prohibida la reproducción parcial o total por cualquier medio sin permiso por escrito del laboratorio.
LASA se responsabiliza exclusivamente del resultado correspondiente a los ensayos en la muestra recibida en el laboratorio, por el contrario, no se responsabiliza de la información proporcionada por el cliente asociada a la muestra así como sus datos descriptivos.
El laboratorio se compromete con la Imparcialidad y Confidencialidad de la información y los resultados (la aceptación de este informe implica la aceptación de la política relativa al tema y declarada en www.laboratoriolasa.com)
Los criterios de conformidad serán emitidos solamente si el cliente lo solicita por escrito.

1 de 1

INFORME DE RESULTADOS

INF. LASA 25-07-22-RS04092
ORDEN DE TRABAJO No. 22-3483

INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE		
SOLICITADO POR: JOHANNA UTRERAS	DIRECCIÓN: AV. ECUATORIANA OE 5-59 Y AMADEO IZQUIETA	TELÉFONO: 0995657077
TIPO DE MUESTRA: LECHE Y DERIVADOS	PROCEDENCIA: PLANTA	
FECHA DE CAD.: 26-07-2022	FORMA DE CONSERVACION: REFRIGERACIÓN	
NOMBRE DEL PRODUCTO: LECHE CRUDA + AFLATOXINA M1 (C2)		
INFORMACIÓN DEL LABORATORIO		
MUESTREO POR: SOLICITANTE	FECHA MUESTREO: N.A.	INGRESO AL LABORATORIO: 18-07-2022
FECHA DE ANÁLISIS: 18-07-2022/ 22-07-2022	FECHA DE ENTREGA: 25-07-2022	
COD. MUESTRA: 22-9979	REALIZACIÓN DE ENSAYOS: LABORATORIO	

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

PARÁMETRO ANALIZADO	RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO DE ANÁLISIS
AFLATOXINA M1	0.325	ppb	PEE.LASA.MB.38 MICROELISA



Mcb. David Bonifaz
JEFE DE DEPARTAMENTO

Elaborado por: Estefanía Fienco

Prohibida la reproducción parcial o total por cualquier medio sin permiso por escrito del laboratorio.

LASA se responsabiliza exclusivamente del resultado correspondiente a los ensayos en la muestra recibida en el laboratorio, por el contrario, no se responsabiliza de la información proporcionada por el cliente asociada a la muestra así como sus datos descriptivos.

El laboratorio se compromete con la Imparcialidad y Confidencialidad de la información y los resultados (la aceptación de este informe implica la aceptación de la política relativa al tema y declarada en www.laboratoriolasa.com)

Los criterios de conformidad serán emitidos solamente si el cliente lo solicita por escrito.

1 de 1

INFORME DE RESULTADOS

INF. LASA 25-07-22-RS04090
ORDEN DE TRABAJO No. 22-3483

<i>INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE</i>		
<i>SOLICITADO POR:</i> JOHANNA UTRERAS	<i>DIRECCIÓN:</i> AV. ECUATORIANA OE 5-59 Y AMADEO IZQUIETA	<i>TELÉFONO:</i> 0995657077
<i>TIPO DE MUESTRA:</i> LECHE Y DERIVADOS	<i>PROCEDENCIA:</i> PLANTA	
<i>FECHA DE CAD.:</i> 26-07-2022	<i>FORMA DE CONSERVACION:</i> REFRIGERACIÓN	
<i>NOMBRE DEL PRODUCTO:</i> LECHE CRUDA + AFLATOXINA M1 (C3)		
<i>INFORMACIÓN DEL LABORATORIO</i>		
<i>MUESTREO POR:</i> SOLICITANTE	<i>FECHA MUESTREO:</i> N.A.	<i>INGRESO AL LABORATORIO:</i> 18-07-2022
<i>FECHA DE ANÁLISIS:</i> 18-07-2022/ 22-07-2022		<i>FECHA DE ENTREGA:</i> 25-07-2022
<i>COD. MUESTRA:</i> 22-9977		<i>REALIZACIÓN DE ENSAYOS:</i> LABORATORIO

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

PARÁMETRO ANALIZADO	RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO DE ANÁLISIS
AFLATOXINA M1	0.565	ppb	PEE.LASA.MB.38 MICROELISA



Mcb. David Bonifaz
JEFE DE DEPARTAMENTO

Elaborado por: Estefanía Fienco

Prohibida la reproducción parcial o total por cualquier medio sin permiso por escrito del laboratorio.

LASA se responsabiliza exclusivamente del resultado correspondiente a los ensayos en la muestra recibida en el laboratorio, por el contrario, no se responsabiliza de la información proporcionada por el cliente asociada a la muestra así como sus datos descriptivos.

El laboratorio se compromete con la Imparcialidad y Confidencialidad de la información y los resultados (la aceptación de este informe implica la aceptación de la política relativa al tema y declarada en www.laboratoriolasa.com)

Los criterios de conformidad serán emitidos solamente si el cliente lo solicita por escrito.

1 de 1